

Marcelo Azambuja Rocha

**Biodegradação de Diclofenaco de Sódio por *Aspergillus* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental-Mestrado, área de concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul- UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Santa Cruz do Sul, janeiro de 2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Marcelo Azambuja Rocha

**Biodegradação de Diclofenaco de Sódio por *Aspergillus* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental- Mestrado, área de concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul- UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Dra. Renata Pereira Limberger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dra. Rosana de Cássia de S. Schneider

Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC)

Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC)

Orientador

Santa Cruz do Sul, janeiro de 2010

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Paulo e Nancy pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos.

A minha namorada Cristina pelo apoio incondicional.

Ao meu irmão Gustavo pelo abrigo em Santa Cruz durante as aulas.

Aos professores Valeriano Corbellini e Ana Lúcia Becker Rohlfes, pela orientação, ajuda e boas idéias.

A todos os meus colegas do MTA pela ajuda durante as aulas.

## RESUMO

Neste trabalho é apresentado um estudo da biodegradação do diclofenaco de sódio, utilizando biomassa de *Aspergillus niger* USP9. O fungo foi selecionado dentro de um total de 13 cepas de *Aspergillus* sp. através do ensaio de citotoxicidade de inibição do crescimento micelial radial (CMR) em dois meios de cultura, ágar Sabouraud e Winogradsky onde a concentração do diclofenaco foi de  $8 \times 10^{-4}$ , a  $2,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> por diluição seriada à metade. Um potente efeito inibitório do fármaco sobre o CMR das cepas fúngicas analisadas foi observado, sendo que no ágar Sabouraud o MIC<sub>50</sub> alcançou  $4 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Em ágar Winogradsky houve maior inibição do CMR nas concentrações iniciais, porém nas concentrações mais elevadas os fungos voltaram a crescer. A cepa fúngica que apresentou menor sensibilidade ao fármaco foi *A. niger* USP9 e foi selecionada para os ensaios de biodegradação. Os esporos dos fungos que cresceram no meio Sabouraud com  $4 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de diclofenaco de sódio foram analisados por espectroscopia no infravermelho e quimiometria e não sendo possível identificar alterações metabólicas nestas células. Os ensaios de biodegradação foram realizados em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de solução tampão de fosfato de sódio pH 7,0 0,1 mol L<sup>-1</sup>, diclofenaco de sódio 1 mg L<sup>-1</sup> e 20 g de biomassa úmida do fungo com e sem esgotamento endógeno (previamente produzida por fermentação submersa a 30 °C em extrato de pó de fumo) com coleta diária por uma semana. A biomassa sem esgotamento endógeno apresentou um consumo máximo do fármaco de 29,6% enquanto que com a biomassa com esgotamento endógeno este valor chegou a 57%. Os cromatogramas indicaram a presença de dois subprodutos do diclofenaco. Os resultados apontaram a relevante toxicidade do fármaco nos fungos testados, no entanto indicam também a capacidade de cepas de *Aspergillus* sp. degradarem o diclofenaco de sódio.

## ABSTRACT

In this work is presented a study of the biodegradation of sodium diclofenac, by using pellets of *Aspergillus niger* USP9. The fungus was selected from a total of 13 strains of *Aspergillus sp.* through the cytotoxicity assay by inhibition of radial mycelial growth (RMG) in two culture media, the Sabouraud and Winogradsky agar, where the concentration of the diclofenac was  $8 \times 10^{-4}$  at  $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  by two-fold serial dilution. A powerful inhibitory effect of the drug upon the RMG of fungal strains analyzed was observed, where the  $\text{MIC}_{50}$  reached  $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  on Sabouraud's medium. On Winogradsky's medium there was a major inhibition of the RMG in the initial concentrations, however in higher concentrations the fungi went back up again. The least sensitive fungal strain to the drug was the *A. niger* USP9 and it was selected to carry out the biodegradation assays. The fungal spores grown on the Sabouraud's medium at sodium diclofenac  $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  were analyzed by infrared spectroscopy and chemometrics not being possible to identify metabolic alterations on these cells. The biodegradation assays were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  sodium phosphate buffer at pH 7.0, sodium diclofenac  $1 \text{ mg L}^{-1}$  and 20g of wet fungal biomass with or without endogenous depletion (previously produced by submerged fermentation at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  in tobacco dust extract) with daily sampling by one week. The biomass without endogenous depletion presented a maximum uptake of 29.6 % and with the biomass with endogenous depletion that value reached 57%. The chromatograms showed the presence of by-products of diclofenac. The results showed the relevant toxicity of the drug on the assayed fungi, however they also indicate the capacity of the fungi of the *Aspergillus sp.* strains to degrade the sodium diclofenac.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Possíveis fontes de entrada de resíduos de fármacos em matrizes ambientais.....	17
Figura 2- Estrutura química do diclofenaco de sódio. ....	20
Figura 3- Fluxograma metodológico.....	29
Figura 4- Curvas de crescimento micelial radial de cepas de <i>Aspergillus</i> sp. em ágar Sabouraud sob diferentes concentrações de diclofenaco de sódio.....	41
Figura 5- Padrões de curvas de atividade fungistática. A = monofásica; B = bifásica e C = trifásica. ....	41
Figura 6- Curvas de crescimento micelial radial relativo de cepas de <i>Aspergillus</i> sp. em ágar Sabouraud sob diferentes concentrações de diclofenaco de sódio. ....	42
Figura 7- <i>Aspergillus niger</i> CMMI14 (A) e <i>Aspergillus niger</i> CMMI01(B) em ágar Sabouraud com diferentes concentrações de diclofenaco de sódio.....	43
Figura 8- Gráfico para a Análise por Componentes Principais dos espectros dos esporos de cepas de <i>Aspergillus</i> sp. com e sem diclofenaco de sódio.....	44
Figura 9- Curvas de crescimento micelial radial de cepas de <i>Aspergillus</i> sp. em ágar Winogradsky sob diferentes concentrações de diclofenaco de sódio. ....	46
Figura 10- Curvas de crescimento micelial radial relativo de cepas de <i>Aspergillus</i> sp. em ágar Winogradsky sob diferentes concentrações de diclofenaco de sódio.. ....	46
Figura 11- Produção de biomassa de <i>Aspergillus niger</i> USP9 em extrato de pó de fumo. ....	48
Figura 12- Curva analítica de diclofenaco de sódio para HPLC.....	49
Figura 13- Concentração residual de diclofenaco de sódio nos sete dias do ensaio de biodegradação com biomassa de <i>Aspergillus niger</i> USP9 com esgotamento endógeno, sem esgotamento endógeno e somente o fármaco. ....	51
Figura 14- Cromatogramas do quarto dia de ensaio de consumo de diclofenaco de sódio por biomassa de <i>Aspergillus niger</i> USP9. A = Biomassa sem o fármaco; B = Fármaco sem a biomassa e C = Biomassa com esgotamento endógeno.....	54
Figura 15- Fórmula estrutural do diclofenaco e de dois de seus metabólitos: 4-hidroxi-diclofenaco e 5-hidroxi-diclofenaco. ....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Solventes e reagentes utilizados nos ensaios de biodegradação do diclofenaco de sódio.....	30
Tabela 2- Parâmetros utilizados nos ensaios de biodegradação .....	37
Tabela 3- Parâmetros de cromatografia líquida utilizados para análise de diclofenaco de sódio.....	38
Tabela 4- Área das colônias de <i>Aspergillus</i> sp. em ágar Sabouraud obtidas com diferentes concentrações de diclofenaco de sódio.....	40
Tabela 5- Área das colônias de <i>Aspergillus</i> sp. em ágar Winogradsky obtidas com diferentes concentrações de diclofenaco de sódio.....	45
Tabela 6- Produção diária de biomassa de <i>Aspergillus niger</i> USP9 .....	47
Tabela 7- Concentração de diclofenaco de sódio presente na solução aquosa nos ensaios de biodegradação utilizando <i>Aspergillus niger</i> USP9. ....	50



## LISTA DE ABREVIATURAS

AINE- Antinflamatório não esteroideal

BCE- Biomassa com esgotamento endógeno

BSE- Biomassa sem esgotamento endógeno

CMR- Crescimento micelial radial

Cox-1- Cicloxigenase-1

Cox-2- Cicloxigenase-2

EDC's-. Perturbadores endócrinos

ETE- Estações de tratamento de esgoto

FDA - *Food and Drug Administration*

HCA- Análise por agrupamento hierárquico

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência

MCP- Pesticida monocrotofos

PCA- Análise por componentes principais

USEPA- United States Environmental Protection Agency

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>1 OBJETIVOS</b> .....	13
1.1 Geral.....	13
1.2 Específicos .....	13
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	14
2.1 Fármacos como contaminantes ambientais .....	14
2.2 Legislação e risco.....	18
2.3 Diclofenaco de sódio .....	19
2.3.1 Farmacocinética .....	21
2.3.2 Toxicidade ambiental do diclofenaco de sódio .....	22
2.4 Biorremediação .....	23
2.4.1 Uso de <i>Aspergillus</i> sp. em biorremediação.....	25
2.5 Ferramentas analíticas para acompanhamento de biodegradação.....	26
2.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	26
2.5.2 Infravermelho associado a ferramentas quimiométricas .....	27
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
3.1 Delineamento da pesquisa .....	29
3.2 Reagentes utilizados .....	30
3.3 Amostragem .....	30
3.4 Seleção da cepa de <i>Aspergillus</i> sp. ....	31
3.4.1 Preparo do ágar Sabouraud.....	31
3.4.2 Preparo do ágar Winogradsky.....	32
3.4.3 Preparo dos inóculos.....	32
3.4.4 Preparo das soluções contendo diclofenaco de sódio .....	32
3.4.5 Preparo das placas com ágar contendo diclofenaco de sódio .....	33
3.4.6 Inoculação nas placas com os meios de ensaio .....	33
3.4.7 Análise do CMR .....	33
3.5 Análise por espectroscopia no infravermelho.....	34

3.5.1 Tratamento dos dados.....	34
3.6 Produção de biomassa por fermentação em fase submersa .....	35
3.6.1 Cepas e manutenção .....	35
3.6.2 Suspensão de esporos.....	35
3.6.3 Determinação de células viáveis ( <i>pour-plate</i> ).....	35
3.7 Produção de biomassa.....	36
3.7.1 Preparo do substrato .....	36
3.7.2 Cinética de crescimento da biomassa .....	36
3.8 Ensaio de biodegradação .....	36
3.8.1 Uso de biomassa sem esgotamento endógeno .....	37
3.8.2 Uso de biomassa com esgotamento endógeno .....	37
3.9 Análise de diclofenaco de sódio por HPLC .....	37
3.9.1 Linearidade do método.....	38
3.9.2 Análise das amostras .....	38
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
4.1 Seleção da cepa de <i>Aspergillus</i> sp .....	39.
4.1.2 Ensaio de CMR .....	39
4.1.2.1 CMR em ágar Sabouraud.....	39
4.1.2.2 CMR em ágar Winogradsky .....	44
4.2 Produção de biomassa de <i>Aspergillus niger</i> USP9 .....	47
4.3 Quantificação dos teores de diclofenaco de sódio .....	49
4.4 Ensaio de biodegradação .....	50
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>57</b>
<b>6 TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>58</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos uma crescente atenção tem sido dirigida à contaminação dos rios, lagos e reservatórios por compostos xenobióticos. Esta preocupação decorre principalmente dos riscos que estes compostos representam em ambientes aquáticos sobre a biota, e nos prejuízos a qualidade de água destinada ao suprimento humano, em razão dos efeitos deletérios associados.

Dentre estes contaminantes, os fármacos têm despertado grande interesse em pesquisas para avaliar seus impactos em matrizes ambientais. Esta preocupação deve-se à presença de fármacos que frequentemente são encontrados em estações de tratamento de esgoto, rios, águas para o consumo humano e solos, em concentrações na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$ .

Fármacos como antibióticos, antiinflamatórios, hormônios, quimioterápicos, têm sido encontrados em diversas matrizes ambientais e em diversos países como Brasil, Inglaterra, Grécia e Alemanha.

Um dos principais problemas que contribui para o acúmulo destes xenobióticos no meio ambiente é a falta de legislação para delimitar a faixa de concentração dos fármacos no ambiente aquático.

Paralelamente a estudos que apontam este problema ambiental, aumentam as pesquisas e estratégias para tratar estes efluentes contaminados, sempre com a preocupação de causar o menor impacto ambiental.

Dentre as técnicas utilizadas para tratamento e remediação destes poluentes, a biorremediação tem sido frequentemente empregada com sucesso. A biorremediação (utilização de organismos vivos para eliminação de compostos tóxicos) vem sendo muito estudada nos últimos anos porque, além de menos dispendiosa, pode resultar na mineralização ou na transformação dos contaminantes em produtos finais inócuos.

Pela biorremediação, grandes volumes de solo, água ou sedimentos podem ser tratados pela estimulação dos microrganismos autóctones ou pela introdução de microrganismos com capacidade comprovada de degradar o poluente.

O presente trabalho justifica-se pelo estudo de metodologias, que visem utilizar microrganismos para biodegradar o antiinflamatório diclofenaco de sódio, um medicamento amplamente utilizado para o tratamento de artrite reumatóide e

osteoartrite, exibindo também atividade analgésica e antipirética. Para isto foram utilizados fungos do gênero *Aspergillus* onde alguns estudos comprovam a sua capacidade de degradar vários compostos orgânicos, sendo, frequentemente, utilizados em estudos de biorremediação.

# 1 OBJETIVOS

## 1.1 Geral

Aplicar fungos do gênero *Aspergillus* para a biorremediação do diclofenaco de sódio visando contribuir para a remediação ambiental de efluentes urbano e de serviços de saúde.

## 1.2 Específicos:

- Selecionar cepas de *Aspergillus* sp. resistentes ao diclofenaco de sódio para a biodegradação deste fármaco em meio aquoso.
- Selecionar substrato para a produção de biomassa de cepa de *Aspergillus* sp. para ensaios de biodegradação utilizando extratos de resíduos vegetais.
- Otimizar condições para a biodegradação de diclofenaco de sódio com biomassa de *Aspergillus* sp. em sistema de fermentação submersa (leito fluidizado, escala de bancada).

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Fármacos como contaminantes ambientais**

A água é hoje reconhecida como um dos bens naturais mais importantes do planeta. A preocupação com o uso, destino e principalmente com o estado de degradação, tem mobilizado profissionais de todas as áreas para a sua preservação.

Os problemas de escassez hídrica no Brasil decorreram, principalmente, da combinação do crescimento exagerado da demanda e da degradação da qualidade das águas. Este quadro é consequência do aumento desordenado dos processos de urbanização, industrialização e expansão agrícola, verificados a partir de 1950.

A mobilização da população do campo para a cidade e a industrialização, além de exercerem aumento significativo na demanda da água dos mananciais, também exigiram o crescimento do parque gerador de energia elétrica que, por sua vez, implicou na necessidade de construções apreciáveis de aproveitamento hidroelétricos. Adicionalmente, o aumento da população demandou por mais produção de alimentos, o que proporcionou o avanço da agricultura irrigada.

A partir de 1970, o interesse da comunidade acadêmica e a criação de órgãos de proteção ambiental, como a United States Environmental Protection Agency (USEPA), promoveram um aumento no número de pesquisas no mundo todo envolvendo o monitoramento dos compostos definidos como xenobióticos, em diversos compartimentos ambientais (DAUGHTON, 2002).

Atualmente, além dos contaminantes prioritários convencionais, especialmente compostos carcinogênicos tóxicos e que manifestam persistência no meio-ambiente, como os pesticidas, metais tóxicos e hidrocarbonetos poliaromáticos, vêm crescendo a preocupação em estudar inúmeros contaminantes considerados emergentes em amostras ambientais (VERENITCH, LOWE, MAZUMBER, 2006).

Podem ser citados como compostos emergentes as toxinas das cianobactérias, agentes de diagnóstico, fragrâncias, surfactantes e seus metabólitos, nitrosaminas, aditivos da gasolina, aditivos industriais e fármacos (RODRIGUEZ-MOZAZ, LOPEZ DE ALDA, BARCELÓ, 2007).

Dentre esses compostos emergentes, os fármacos vêm recebendo muita atenção em pesquisas ambientais, pois a poluição por eles provocada é um fenômeno complexo. Assim o impacto da sua presença em águas ainda é um problema pouco conhecido e os dados existentes sobre a sua biodegradação, toxicidade e destino no meio-ambiente são insuficientes (HALLING-SÖRENSEN et al., 1998).

Esses compostos já estão presentes no meio-ambiente por um longo tempo, mas a sua importância e presença neste meio, somente agora estão sendo elucidadas. O interesse crescente na determinação destes contaminantes ocorre pelo fato de que eles não estão inseridos em legislações que regulamentam a qualidade da água. Estes podem ser candidatos para futuras legislações, dependendo das pesquisas sobre sua toxicidade e efeitos potenciais ao meio ambiente e a saúde humana (HERNÁNDEZ et al., 2007).

Outro fato que tem despertado o interesse no monitoramento de fármacos residuais é devido ao fato de muitas destas substâncias serem freqüentemente encontradas em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) e águas naturais em concentrações na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$ .

A ocorrência de fármacos residuais no esgoto doméstico e águas é um importante tópico internacional. Estudos demonstram que esses fármacos e seus metabólitos estão presentes em ambientes aquáticos em várias partes do mundo como Alemanha, Brasil, Canadá, Holanda, Inglaterra, Itália, Suécia, Estados Unidos e Reino Unido (BILA, DEZOTTI, 2003).

A grande preocupação com a presença destes fármacos residuais em matrizes ambientais são os potenciais efeitos adversos para a saúde humana, animal e de organismos aquáticos, como por exemplo, peixes, crustáceos, etc.

Os fármacos são considerados poluentes ambientais devido a estas moléculas serem biologicamente ativas. Além disso, a grande maioria dos fármacos possui características lipofílicas e frequentemente apresentam baixa biodegradabilidade no ambiente. Estas propriedades intrínsecas apresentam um grande potencial para bioacumulação e persistência no ambiente (CHRISTENSEN, 1998).

Estudos ecotoxicológicos demonstram que estes efeitos podem ser detectados em qualquer nível de hierarquia biológica: célula, órgãos, organismos, populações e ecossistemas (SANDERSON et al., 2004).



Atualmente existem cerca de 11 milhões de substâncias químicas registradas no Chemical Abstracts Service (CAS). Nos Estados Unidos e Japão, cerca de 100.000 compostos são produzidos deliberadamente e utilizados para diversos fins. Apenas nos Estados Unidos são registrados de 1.200 a 1.500 substâncias químicas por ano. No planeta, aproximadamente 3.000 compostos são produzidos em larga escala atingindo quantidades superiores a 500.000 Kg por ano. Destes, menos de 45% foram submetidos a algum tipo de ensaio toxicológico básico e menos de 10% foram estudados quanto aos efeitos tóxicos sobre organismos em desenvolvimento (MELLO-DA-SILVA, FRUCHTENGARTEN, 2005).

Os ensaios ecotoxicológicos realizados hoje são desenvolvidos com sistemas teste estabelecidos com organismos tradicionais objetivando a determinação da mortalidade. Entretanto estes testes deveriam ser realizados objetivando o efeito do fármaco em organismos vertebrados e invertebrados baseado na hipótese de semelhança no modo de ação. Assim, a ecotoxicologia testa somente o efeito agudo destes compostos em organismos vivos de diferentes níveis tróficos e, só raramente os testes são conduzidos a exposições crônicas (FENT, WESTON, CAMINADA, 2006).

Fármacos ácidos são os principais produtos farmacêuticos e produtos de cuidados pessoais que têm sido detectados em ambiente aquático (XIU-SHENG, KOENIG, METCALFE, 2002).

O metabólito do antilipêmico ácido clofíbrico foi o primeiro resíduo de fármaco a ser reportado em esgoto e é frequentemente detectado no mundo todo seja em efluentes de esgoto, água suja, de superfície e potável (KOUTSOUBA et al., 2003).

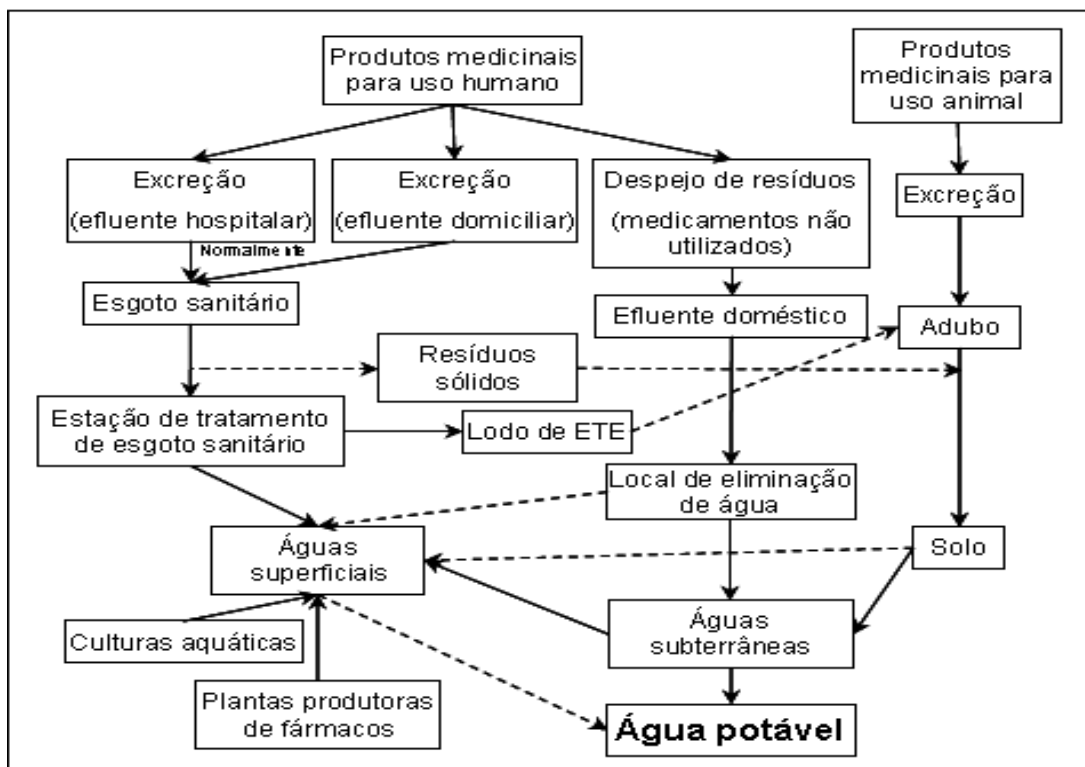
O diclofenaco foi detectado em concentrações de até  $0,81 \mu\text{g L}^{-1}$  em efluentes e nas águas superficiais na Áustria, Brasil, Alemanha e Grécia (HEBERER, 2002). Em um estudo realizado em ETE do município de Araraquara-SP, constatou-se a presença do diclofenaco antes e após o tratamento e as concentrações foram  $2,12$  e  $3,52 \mu\text{g L}^{-1}$  na coleta feita em março e  $18,0$  e  $22,0 \mu\text{g L}^{-1}$  na coleta feita em setembro de 2006, indicando que a concentração do fármaco é maior nos meses mais frios onde cresce o consumo de medicamentos (PERON, 2007).

Stumpf et al. (1999) realizaram um estudo a respeito da presença de resíduos de fármacos polares nas águas naturais e nos efluentes das estações de tratamento de esgoto no estado do Rio de Janeiro. Os autores estudaram principalmente o

diclofenaco, ibuprofeno e o naproxeno. A concentração média no efluente das ETE's, para a maioria dos fármacos estudados ficou na faixa de 0,1 a 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

A mais significativa rota de entrada de fármacos no ambiente aquático é através de estações de tratamento de esgotos (ETE). Quando o esgoto é encaminhado para a ETE o xenobiótico presente pode ser biodegradado, degradado, totalmente ou parcialmente, ou ainda permanecer inalterado, contaminando o ambiente através de uma variedade de caminhos (HEBERER, 2002).

Segundo Suchara (2007), outras fontes destes resíduos são a lixiviação de aterros de lixo, os resíduos provenientes de indústrias farmacêuticas, o uso na agropecuária, onde grande quantidade de drogas veterinárias e aditivos estão presentes nas rações de criações de animais, nos efluentes de fazenda de criação de peixe, no esterco utilizado como fertilizantes assim como o uso do lodo digestivo proveniente de ETE usado na agricultura, ao consumo humano de medicamentos em altas doses, a persistência de drogas não metabolizadas e o destino inadequado de medicamentos vencidos, tanto em farmácias, drogarias, hospitais, residências. Estes fatores podem ser melhor observados no fluxograma apresentado na Figura 1 que mostra o caminho dos fármacos no meio ambiente (HEBERER, 2002).



**Figura 1-** Possíveis fontes de entrada de resíduos de fármacos em matrizes ambientais.

## 2.2 Legislação e risco

A presença de fármacos no meio ambiente representa riscos ainda pouco conhecidos e poucas normas existem para regular sua presença.

O efeito dos fármacos na saúde humana deve ser examinado de maneira ordenada e qualitativa, levando em consideração as preocupações especiais e as necessidades da sociedade considerando as classes e produtos. Assim pode-se destacar o uso de antibióticos, que é uma grande preocupação dos especialistas devido a esta classe de fármacos ocasionarem o desenvolvimento de resistência em populações bacterianas. O aumento do uso e tipos de antibióticos durante as últimas cinco décadas resultou em uma seleção genética de bactérias resistentes, com efeito a longo prazo e provavelmente irreversíveis (SANDERSON et al., 2004).

Embora esses antibióticos geralmente sejam encontrados em concentrações pelo menos 1000 vezes menores que as concentrações necessárias para inibir o crescimento de bactérias resistentes, as concentrações dos agentes microbianos encontrados em esgoto municipal podem afetar as bactérias suscetíveis e, por esta razão, têm o potencial de determinar uma seleção a favor das bactérias resistentes (HIRSCH et al., 1999).

Destaca-se também um grupo específico de compostos químicos, presentes no meio ambiente, que são responsáveis por causar perturbações no sistema endócrino (hormonal) em organismos humanos e animais: são os chamados perturbadores endócrinos (EDC's). Dentre esse grupo de substâncias estão os estrogênios naturais e contraceptivos (BILA et al., 2007).

Alguns autores relatam que, dependendo da dose e do tempo de exposição, é possível que essas substâncias estejam relacionadas com doenças como câncer de mama, testicular e de próstata, ovários policísticos e redução da fertilidade masculina (MILLS, CHICHESTER, 2005).

Os Estados Unidos regulamentam produtos farmacêuticos no meio ambiente através da Agência dos Estados Unidos para Administração de Alimentos e Drogas (USFDA). Essa regulamentação ocorre através de processos de revisão ambiental requerido para novas drogas submetidas ao FDA, no entanto essa avaliação somente foi solicitada nos últimos anos. Contudo, a USEPA não tem uma

regulamentação nacional primária de água de beber para estes poluentes (KOT-WASIK, DEBSKA, NAMIES'NIK, 2006).

Na Europa normas redigidas para avaliação do risco ambiental estão disponíveis já há alguns anos e em 2005, novas regras foram disponibilizadas. A novidade dessa edição foi o requerimento para testes para ecotoxicidade crônica preferencialmente ao agudo, reconhecendo que a maioria dos compostos farmacêuticos ativos pode apresentar em longo prazo, efeitos crônicos em baixos níveis (KOT-WASIK, DEBSKA, NAMIES'NIK, 2006).

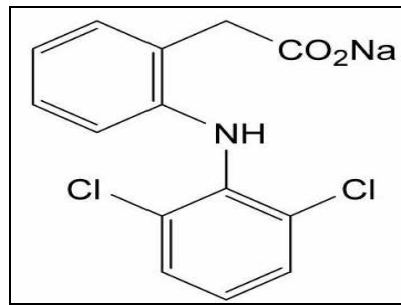
Segundo a Agência Européia para Produtos Medicinais (EMA), se o valor de concentração ambiental predito encontrado estiver abaixo de  $0,01\mu\text{g L}^{-1}$  o risco para o ambiente pelo produto medicinal é considerado improvável. Acima de  $0,01\mu\text{g L}^{-1}$ , a análise do efeito ambiental deve ser executada (KNACKER, 2003).

No Brasil não existe nenhuma legislação que trate os fármacos como poluentes, o que desobriga as empresas administradoras de ETE de fazerem a remoção destes xenobióticos.

Efeitos de toxicidade costumam ser observados somente em concentrações acima de  $1\mu\text{g L}^{-1}$ , no entanto, é importante salientar que os bioensaios de toxicidade focam efeitos agudos, quando na realidade os organismos aquáticos são expostos a baixas concentrações de forma contínua e, portanto efeitos crônicos são mais prováveis (FENT, WESTON, CAMINADA, 2006).

### **2.3 Diclofenaco de sódio**

O diclofenaco (ácido[2-(2,6-dicloroanilino)fenil]acético) é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) potente, pertencente ao grupo derivado do ácido fenilacético, amplamente empregado na forma de sal sódico, em condições inflamatórias, sendo indicado, sobretudo, para o tratamento da artrite reumatóide e da osteoartrite. O diclofenaco de sódio exibe também atividade analgésica, antipirética e anti-dismenorréica (KOROLKOVAS, 2003). Na Figura 2 está representada a estrutura química do diclofenaco de sódio.



**Figura 2-** Estrutura química do diclofenaco de sódio

Apresenta-se como pó cristalino, levemente higroscópico, praticamente inodoro, de cor amarelo fraco a bege brilhante, muito solúvel em água, metanol, acetona e com a diminuição do pH a solubilidade diminui e aumenta em valores de pH acima de 6,5. Seu ponto de fusão é na faixa de 283- 285 °C e peso molecular de 318,14 (THE MERCK INDEX, 2001)

Sua ação farmacológica é similar aquela dos outros AINE. Este grupo de fármacos atua inibindo a atividade da enzima cicloxigenase, resultando no decréscimo da formação dos precursores de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico. Existem pelo menos duas isoenzimas, a cicloxigenase-1 (Cox-1) e cicloxigenase-2 (Cox-2) que catalisam a formação das prostaglandinas. Embora os exatos mecanismos não tenham sido claramente elucidados, os AINEs parecem exercer atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética, principalmente por meio da inibição da Cox-2 (KOROLKOVAS, 2003).

O principal problema associado à terapia com AINE reside na capacidade destes fármacos induzirem injúria da mucosa gastroduodenal, com o possível surgimento de úlcera gástrica, sangramento e perfuração da mucosa, bem como o risco aumentado de sangramento em portadores de úlcera péptica. Ainda, sob certas condições, a toxicidade renal pode ocorrer, embora menos freqüente.

O risco individual de toxicidade pelos AINEs é baixo, porém, considerando-se o amplo uso destes fármacos, o numero de casos é grande e com gravidade considerável. Os fatores de risco para pacientes são: idade superior a 65 anos, doenças associadas, histórico prévio de úlcera péptica, uso concorrente de corticosteróide ou anticoagulante, doses altas ou uso múltiplo de AINE (McEVOY, 2000).

### 2.3.1 Farmacocinética

O diclofenaco é rapidamente e quase completamente absorvido a partir do trato gastrointestinal, entretanto, este fármaco sofre extenso metabolismo de primeira passagem no fígado, com apenas cerca de 50-60% da dose alcançando a circulação sistêmica na sua forma inalterada. O diclofenaco também é absorvido na circulação sistêmica após administração retal, percutânea e administração tópica, quando incorporada em um gel.

O pico de concentração plasmática do diclofenaco geralmente ocorre dentro de 1 hora e de 10 a 30 minutos após administração oral de comprimidos convencionais e de solução, respectivamente. Para comprimidos de liberação retardada, a concentração plasmática máxima varia segundo a dose, ocorrendo após 1,5-3 horas e atingindo concentrações de 0,5-1, 1-1,5, 2-2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , após a administração de 25, 50 e 75 mg de diclofenaco, respectivamente.

A distribuição do diclofenaco nos fluidos e tecidos do corpo humano não está completamente caracterizada. Após a administração intravenosa em ratos, o fármaco é amplamente distribuído, alcançando concentrações mais altas na bile, fígado, sangue, coração, pulmões e rins e concentrações mais baixas nas glândulas adrenais, tireóide, salivares, bem como pâncreas, baço, músculos, cérebro e espinha dorsal (McEVOY, 2000).

De modo semelhante aos outros AINEs, o diclofenaco é distribuído para o líquido sinovial, alcançando um pico de concentração correspondente a 60 - 70% do pico plasmático após administração oral. Entretanto, as concentrações deste fármaco e dos seus metabólitos no fluido sinovial são excedidas substancialmente àquelas do plasma após 3-6 horas.

A concentração de diclofenaco no plasma parece diminuir de maneira trifásica. Após administração intravenosa em adultos saudáveis, o diclofenaco apresenta tempo de meia-vida plasmática de cerca de 3 minutos na fase inicial de distribuição; aproximadamente 16 minutos na fase intermediária (redistribuição) e por volta de 1-2 horas na fase terminal (eliminação).

O mecanismo exato de eliminação do diclofenaco não está completamente elucidado, mas o fármaco é rapidamente e extensivamente biotransformado no fígado. Após a administração oral ou intravenosa do fármaco em adultos saudáveis,

cerca de 50-70% da dose é excretada na urina e aproximadamente 30-35% é excretado nas fezes (McEVOY, 2000).

### 2.3.2 Toxicidade ambiental do diclofenaco de sódio

As informações sobre o sinergismo e efeitos adicionais, metabolismo, dispersão e bioacumulação nos organismos são escassas. AINEs como o diclofenaco e o ibuprofeno possuem valores de  $\log K_{ow}$  acima de três, indicando que eles possuem a capacidade de se bioacumular nos tecidos dos organismos (NAKADA et al., 2007).

Existem evidências de que uma exposição prolongada a concentrações ambientalmente relevantes de diclofenaco conduz a alterações na saúde dos peixes (HONG et al., 2007), induzindo a lesões renais e alterações nas brânquias, onde a menor concentração em que se observam os efeitos é a de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (SCHWAIGER et al., 2004).

Apesar de estudos terem mostrado que o diclofenaco é rapidamente degradado por fotólise direta sobre as condições normais no meio ambiente (BARTELS, VON TÜMPLING Jr, 2007), ele continua sendo um dos fármacos mais comumente detectado em água em concentrações maiores que  $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$  (AGÜERA et al., 2005).

Esses dados indicaram que uma contínua introdução do diclofenaco no meio-ambiente pode ser explicada, em parte, pela ineficiência dos processos biológicos utilizados nas estações de tratamento de esgotos em remover fármacos.

Cleuvers (2003) realizou bioensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna* (perda da mobilidade do crustáceo após 48 horas), *Desmodesmus subscpicatus* e *Lemna minor* (inibição do crescimento da alga após 3 e 7 dias respectivamente) e determinou a concentração de fármaco que causa efeito negativo mensurável em 50% da população ( $EC_{50}$ ) e os testes realizados com o anti-inflamatório diclofenaco mostrou-se tóxico para *Lemna minor* ( $EC_{50} = 7,5 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Schwaiger et al. (2004) avaliaram os efeitos tóxicos subletais do diclofenaco em peixes, utilizando a truta *Oncorhynchus mykiss*, a qual foi exposta a concentrações de diclofenaco de 1 a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  por um período de 28 dias. As

análises mostraram que ocorreram alterações nos rins e nas brônquias quando a concentração de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  foi utilizada. Os autores observaram também o acúmulo do fármaco em todos os órgãos examinados e que a maior concentração se encontrava no fígado, seguido por rins, brônquias e tecidos musculares respectivamente.

Os limites toxicológicos para o diclofenaco em água foram estabelecidos em pesquisa desenvolvida na Holanda. Estes limites foram baseados sobre 10% da dose máxima diária aceitável ou para o limite máximo permitido para resíduo de fármacos veterinários em leite, considerando o peso médio de uma pessoa de 60 Kg e a dose diária de 2 litros de água, onde foi estabelecido o limite para o fármaco em água para beber de  $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Cooper, Siewicki & Phillips (2008) estabeleceram um *ranking* da toxicidade de vários fármacos, tendo como foco alguns organismos marinhos. Os autores separaram os fármacos em cinco combinações diferentes, segundo dados toxicológicos e características físico-químicas. Os resultados mostraram que os fármacos prescritos para doenças do sistema nervoso central, problemas cardiovasculares e infecções, foram os que se apresentaram mais tóxicos. Os autores relataram também que o diclofenaco, assim como o ibuprofeno e a oxitetraciclina, encontra-se entre os 10 fármacos mais tóxicos, enquanto que, o 17- $\alpha$ -estradiol e o metropolol se encontram em 42º e 231º lugar, respectivamente.

## 2.4 Biorremediação

A capacidade dos microrganismos de degradar compostos orgânicos é cientificamente reconhecida e vem sendo utilizada ao longo do tempo em processos de tratamento biológico de efluentes líquidos de resíduos sólidos. Graças a essa habilidade, tem sido desenvolvidos processos biotecnológicos destinados a diversas finalidades, dentre os quais destacam-se a degradação de poluentes, a lixiviação de minerais, a desobstrução de poços de petróleo e a recuperação de locais contaminados: solos, águas superficiais e subterrâneas. Tais microrganismos podem ser encontrados impactados pelo xenobiótico no próprio ambiente, sendo, na maioria das vezes, os responsáveis pelo desaparecimento dos contaminantes (OLIVEIRA, 2002).



A biodegradação é o mecanismo de degradação mais importante para os compostos orgânicos na natureza e, ao contrário de outros processos, ela elimina os contaminantes sem dispersá-los nos meios. Os produtos finais dessa degradação são dióxido de carbono, água e biomassa microbiana. A velocidade e a eficiência da biodegradação dependem da composição química do produto liberado, associado a fatores ambientais específicos (AZEVEDO, CHASIN, 2003).

Um importante processo na remoção dos fármacos na água, principalmente no efluente de esgoto é sua biodegradação utilizando microrganismos capazes de inativar parcialmente ou totalmente estes compostos, sem a geração de subprodutos com efeitos semelhantes (JONES et al., 1998).

Uma das características das populações microbianas é a capacidade de adaptação a presença de compostos químicos no ambiente, através de mutação, indução ou inibição seletiva de um ou mais membros da comunidade.

Segundo Chernicharo (1997), a toxicidade é considerada um dos principais empecilhos para a aplicação de processos de biodegradação. Vários compostos orgânicos e inorgânicos podem ser tóxicos ou ter efeitos inibitórios sobre o processo de digestão anaeróbia. Os microrganismos usualmente têm uma habilidade para se adaptar a altas concentrações de muitos materiais inibidores.

Uma mistura complexa de microrganismos pode se adaptar à presença de determinados xenobióticos, de forma a aproveitar ao máximo os metabólitos produzidos entre as diferentes espécies, aumentando a eficiência do processo de degradação (FERNICOLA, OLIVEIRA, 2002).

Em um ambiente contaminado, os hidrocarbonetos são, geralmente, degradados por bactérias, havendo também a possibilidade de atuação de fungos neste processo. Porém, a contribuição de cada um varia com os fatores ambientais e as propriedades físico-químicas do solo. Desta forma, consideram-se os fungos mais eficientes sob condições adversas: solos com valores extremos de pH, limitação de nutrientes e com baixo teor de umidade (CUNHA, 1996).

Couto (2000) também observou uma excelente eficiência no tratamento de uma amostra contendo uma solução de corante (Poli-R-478), alcançando remoções superiores a 95% após o tratamento com fungos, no caso o *Phanerochaete chrysosporium*.

#### 2.4.1 Uso de *Aspergillus* sp. em biorremediação

Fungos são microrganismos capazes de degradar vários compostos orgânicos recalcitrantes: fenóis clorados (pentaclorofenol, triclorofenol e diclorofenol), inseticidas (DDT, lindane, dieldrin), anilinas cloradas (3,4-dicloroanilinas), dioxinas (diclorodibenzeno-p-dioxina, tetraclorodibenzeno-p-dioxina), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (fluoreno, antraceno, pireno) e corantes (cristal violeta, azul bromo fenol, azocorantes) (POINTING, 2001; SHA, NERUD, 2002; WESENERG, KYRIAKIDES, AGATHOS, 2003).

Representantes do gênero *Aspergillus* têm habilidade de mineralizar xenobióticos tais como organofosforados e podem ser usados como excelente biorremediadores de solos contaminados por poluentes (BHALERAO, PURANIK, 2009).

Bhalerao et al. (2009), preocupados com o impacto negativo que o uso de pesticidas organofosforados poderiam causar na agricultura da Índia, isolaram de solos contaminados com o pesticida monocrotofos fungos do gênero *Aspergillus oryzae*, e concluíram que este microrganismo poderia ser utilizado para o bioaumento de solo contaminado com MCP e para o tratamento de resíduos aquosos.

*Aspergillus niger* é conhecido principalmente, por sua capacidade de produzir enzimas e ácidos orgânicos por fermentação, especialmente ácido cítrico. Muitos pesquisadores apostaram na eficiência desta espécie na remoção de substâncias complexas e de poluentes como metais pesados. O potencial dos representantes deste gênero para a biorremediação *in situ* tem sido atribuído a sua habilidade em degradar uma variedade de xenobióticos via um mecanismo de radical livre mediado pelas peroxidases extracelulares Lip e MnP-e laccase, que são componentes-chave para o sistema enzimático.

Goswami, Vig e Singh (2009) estudaram a biodegradação do inseticida endosulfan e os seus metabólitos tanto em caldo de cultura bem como microcosmo do solo. Neste estudo, isolaram um cepa de *Aspergillus sydoni* em que conseguiram uma taxa de biodegradação de 97%, concluindo que este microrganismo pode ser utilizado para biorremediação de sítios contaminados.

Fungos do gênero *Aspergillus* apresentaram elevada capacidade de crescimento em meios com 50 ppm de atrazina, indicando a possibilidade destes fungos serem utilizados para biorremediação em solos contaminados com pesticidas triazínicos (COLLA, PRIMAZ, BERTOLIN, 2008).

Price, Classen e Payne (2001), trabalhando com rejeitos líquidos da suinocultura contendo elevados teores de cobre e zinco, observaram que os metais pesados poderiam ser acumulados em níveis fitotóxicos em solos utilizados para agricultura, sendo novamente *Aspergillus niger* apontado como o fungo, dentre vários estudados, que apresentou maior potencial para este propósito. O fungo foi capaz de crescer em placas de Petri adicionados de cobre, em um nível cinco vezes superior ao inibitório para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. Também foi evidenciada a capacidade para detoxificar o ambiente contaminado. Os resultados mostraram que *A. niger* foi capaz de remover 91% de cobre e 7% de zinco do efluente tratado.

Ren et al (2009) investigaram a biolixiviação de solos contaminados com metais pesado utilizando ácidos orgânicos fracos produzido pelo fungo *Aspergillus niger*. Estes ácidos orgânicos foram eficazes para a solubilização dos metais, solubilizando 97,5% de Cu, 88,2% de Cd, 26% de Pb e 14,5% de Zn, indicando que *A. niger* tem o potencial para ser utilizado para biolixiviação de solos contaminados por metais pesados.

## **2.5 Ferramentas analíticas para o acompanhamento de biodegradação**

### **2.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência**

Existem diversas técnicas que compõe o elenco de variedades de cromatografias, porém, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE) é a técnica mais utilizada na atualidade. A HPLC tem sido aplicada nas áreas de química, bioquímica, farmacêutica, alimentícia, biotecnológica, biológica e ambiental. Podem ser detectados carboidratos, aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, fármacos, drogas de abuso, pesticidas e esteróides (SHUCHARA, 2007).

Bhalerao & Puranik (2009), utilizaram HPLC como ferramenta para o acompanhamento dos ensaios de biodegradação do pesticida monocrotofos pelo fungo *Aspergillus orizae*. Também, utilizando o mesmo equipamento foram feitas as análises para detecção de ácidos orgânicos produzidos por *Aspergillus niger* usados para biolixiviação de solos contendo metais pesados (REN et al.,2009).

Alguns trabalhos com biodegradação e degradação do diclofenaco utilizam a HPLC como ferramenta analítica para a quantificação do fármaco durante o ensaio. Marco-Urrea et al. (2009) utilizaram a HPLC para acompanhar o experimento de biodegradação por *pellets* do fungo *Trametes versicolor* conseguindo uma boa linearidade e especificidade. Também na degradação do diclofenaco por ozonização a mesma ferramenta cromatográfica foi utilizada com êxito (ROCHA et al., 2009)

## **2.5.2 Infravermelho associado a ferramentas quimiométricas**

Os espectros de infravermelho associados a ferramentas quimiométricas têm sido utilizados no controle de qualidade de produtos químicos e também na área ambiental. Os métodos de análise multivariada são aplicados com grande sucesso para dados experimentais de vários tipos, a fim de construir modelos de previsão para analitos seletos em amostras biomédicas. Entre as diversas ferramentas quimiométricas podem ser citadas as de análise exploratória, como a Análise por Componentes Principais (PCA) e Análise por Agrupamento Hierárquico (HCA).

A PCA é um método de “compressão” de dados que se baseia na correlação de variáveis. Realizar o agrupamento de variáveis correlacionadas substituindo o conjunto total de variáveis por um novo conjunto denominado “componentes principais”, nos quais os dados serão projetados. A HCA realiza a organização dos dados de maneira a enfatizar seus agrupamentos naturais e padrões. Os resultados, de caráter qualitativo, são apresentados na forma de um dendrograma, o qual permite a visualização das amostras ou variáveis no espaço bidimensional (FERREIRA, 2002).

O espectro de infravermelho de células microbianas intactas corresponde à Impressão digital metabólica que é uma característica única e específica de cada microrganismo. O espectro de infravermelho microbiano é útil para a detecção *in situ*

de compostos ou estruturas como corpos de inclusão, materiais armazenados e endósporos, para monitorar e quantificar o CO<sub>2</sub> metabolicamente produzido pela utilização de diversos substratos e para caracterizar o fenômeno de crescimento celular e as interações entre células e drogas. As informações características úteis para a caracterização microbiana geralmente encontram-se distribuídas sobre todo o espectro de infravermelho (NAUMANN, 2000).

A espectroscopia também pode ser aplicada para a identificação de metabólitos sintetizados e excretados por microrganismos, como ácido láctico, ácido acético, etanol, glicose, poli-hidroxicanoatos e, recentemente, proteínas recombinantes. As análises possibilitam a quantificação do analito e contribuem para a classificação de cepas desconhecidas (KANSIZ, BILMAN-JACOB, McNAUGHTON, 2000).

Lin et al. (2005) utilizaram a espectroscopia FTIR para caracterização de *Alicyclobacillus* em suco de maçã, identificando diferenças na composição de suas membranas celulares e permitindo o agrupamento de amostras semelhantes pela aplicação de ferramentas quimiométricas. Outras aplicações foram descritas para discriminação e classificação de bactérias do gênero *Enterococcus*, diferenciação de amostras de *Escherichia coli*, caracterização de isolados de *Streptomyces*, diferenciação de amostras de *Pseudomonas* sp. e identificação de espécies de *Lactobacillus acidophilus* entre outros.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento da pesquisa

Dentre uma amostragem de treze cepas de *Aspergillus sp.* foi utilizado o ensaio de toxicidade de determinação do crescimento micelial radial (CMR) para selecionar cepas que melhor se desenvolvem quando inoculados em meios que contivessem o fármaco diclofenaco de sódio.

O fungo selecionado foi adicionado ao caldo de extrato de pó de fumo para fermentação em fase submersa e produção de *pellets* de biomassa fúngica, em um período de seis dias. Esta biomassa foi utilizada para o experimento de biodegradação do xenobiótico, que ocorreu em cultivo submerso em um período de 7 dias com coleta de alíquotas diárias.

Para o acompanhamento dos ensaios foram utilizadas como ferramentas analíticas HPLC e DRIFTS associados a ferramentas quimiométricas.

O fluxograma da Figura 3 descreve de forma esquemática a metodologia utilizada para condução deste experimento.

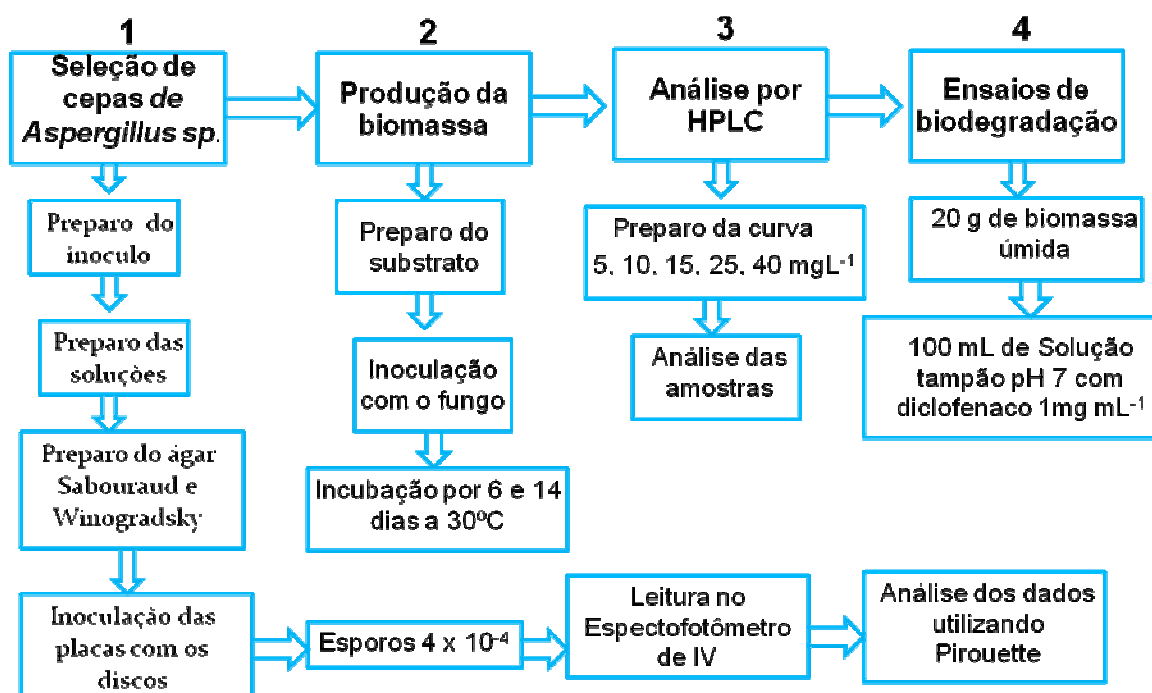


Figura 3- Fluxograma metodológico

### 3.2 Reagentes utilizados

Os reagentes utilizados encontram-se discriminados na Tabela 1.

**Tabela 1-** Solventes e reagentes utilizados nos ensaios de biodegradação do diclofenaco de sódio.

Descrição	Marca
Agar Sabouraud	Oxoid
Di- hidrogenofosfato de potássio	Nuclear
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	Nuclear
Cloreto de sódio	Nuclear
Sulfato férrico	Nuclear
Nitrato de amônio	Nuclear
Agar bacteriológico	Nuclear
D-glicose	Vetec
Sulfato manganoso	Vetec
KBr	Merk
Acetonitrila (grau HPLC)	Nuclear
Alcool metílico	Merk
Ácido clorídrico	Synth
Diclofenaco de sódio	Galena
Dimetilsulfóxido	Nuclear

### 3.3 Amostragem

A amostragem foi constituída por oito cepas de *Aspergillus niger*, assim caracterizadas: USP9, CMMI14, CMMI01, CMMI18, CMMI111 ACI-III, Bahia CMMI-3 e USP898; três cepas de *Aspergillus terreus*: USP1, CMMI233-3 e USP484, e por duas cepas de *Aspergillus fumigatus*, denominados como USP174 e USP2. A sigla

USP refere-se a microrganismos pertencentes à coleção de fungos da Universidade de São Paulo e foi cedido pelo laboratório de Imunologia de Fungos da Universidade do Rio Grande do Sul. A sigla CMMI refere-se a fungos pertencentes à Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Industrial da Universidade de Santa Cruz do Sul- UNISC. Os fungos foram mantidos em ágar Sabouraud a 30°C, com repiques mensais.

### **3.4 Seleção da cepa de *Aspergillus* sp.**

Para escolha da cepa de *Aspergillus* sp. capaz de biodegradar o fármaco, utilizou-se o método de avaliação do CMR, para testar a toxicidade do fármaco nas cepas, sendo que o fungo selecionado foi o que apresentou menor sensibilidade ao xenobiótico testado.

Para esta técnica foram utilizados dois meios diferentes: Sabouraud-dextrose, com elevada fonte de carbono (açúcares) e nitrogênio, e Winogradsky, salino e com ínfima quantidade de carbono.

#### **3.4.1 Preparo ágar Sabouraud**

Para preparação do meio foram pesados 65 g do ágar Sabouraud e adicionado 1 litro de água deionizada. O conteúdo foi dissolvido com o auxílio de um forno micro-ondas, e após estar solúvel e homogeneizado foi colocado em autoclave por 15 minutos a 120°C.

#### **3.4.2 Preparo ágar Winogradsky**



O meio constitui de 15 g de ágar bacteriológico, 1 g de glicose, 2,5 g de cloreto de sódio, 2,5 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 5 g de di-hidrogenofosfato de potássio, 10 g de nitrato de amônio, 0,005 g de sulfato férrico e 0,005 g de sulfato manganoso. A preparação deste meio foi realizada em duas fases, sendo a fase I constituída pelo ágar bacteriológico e 500 mL de água deionizada e a fase II contendo os demais constituintes adicionado de 500 mL de água deionizada. A fase I foi dissolvida com o auxílio de forno micro-ondas e homogeneizada por agitação com bastão de vidro. As duas fases foram autoclavadas separadamente a uma temperatura de 120°C por 15 minutos. Após verteu-se a fase I sobre a fase II.

#### **3.4.3 Preparo dos inóculos**

Em tubos de ensaio contendo 5 mL do ágar Sabouraud estéril e ainda fundido, foram adicionados com o auxílio de uma alça metálica, repiques de uma cultura de 15 dias das amostras citadas no item 3.3. Estes tubos foram agitados vigorosamente em agitador Vortex.

O ágar ainda liquefeito foi transferido em condições assépticas para uma placa de Petri, e posteriormente incubadas por 24 horas a 30°C. Após este período, foram recortados discos de 5 mm de diâmetro com um *punch biopsy* que foram invertidos e depositados sobre as placas contendo o ágar teste. O mesmo procedimento foi realizado utilizando o ágar Winogradsky.

#### **3.4.4 Preparo das soluções contendo diclofenaco de sódio**

As soluções de diclofenaco de sódio foram preparadas com dimetilsulfóxido (DMSO) como diluente, de modo a obter solução-mãe de  $8 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . Em

seguida foram preparadas cinco dissoluções seriadas à metade de modo a obter soluções em concentrações de  $4 \times 10^{-2}$ ,  $2 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-3}$  e  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

#### **3.4.5 Preparo das placas com ágar contendo o diclofenaco de sódio**

A cada tubo de ensaio contendo 9,9 mL de ágar Sabouraud, esterilizado e ainda fundido, foi adicionado 0,1 mL de solução com o fármaco. Homogeneizou-se em Vortex e verteu-se em placas de Petri de 8 cm de diâmetro, obtendo um volume total de 10 mL por placa. Assim, foi obtida cada uma das concentrações requeridas:  $8 \times 10^{-4}$ ,  $4 \times 10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$  e  $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . O mesmo procedimento foi realizado utilizando ágar Winogradsky.

#### **3.4.6 Inoculação nas placas com os meios de ensaio**

Discos das culturas de *Aspergillus* foram depositados invertidos (com a cultura para baixo) em triplicata sobre os meios com as diferentes concentrações de diclofenaco de potássio. Também foram aplicadas em placas controle, onde continha 9,9 mL dos meios utilizados, adicionado de 0,1 mL de DMSO.

As placas foram levadas a estufa na temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ , sendo que as com o ágar Sabouraud permaneceram por 24 horas e as placas com o ágar Winogradsky foram retiradas após 48 horas de incubação (isto porque este meio tem pouca fonte de carbono, o que retarda o desenvolvimento dos fungos).

#### **3.4.7 Análise do CMR**

Após incubação os diâmetros foram mensurados com paquímetro digital a fim de verificar o tamanho do micélio do fungo. O diâmetro médio representativo de

cada concentração avaliada foi calculado através da média aritmética dos diâmetros de cada triplicata de cada concentração.

Utilizando o software Origin® 6.0, os dados foram tabelados e posteriormente confeccionado o gráfico onde têm-se: diâmetro dos halo *versus* concentração do fármaco, assim como também obteve-se o gráfico onde é apresentada a porcentagem de inibição de crescimento da colônia, onde foram usados como base as placas controle (100% de crescimento). Estes gráficos revelaram o fungo que teve menor inibição de crescimento em contato com o fármaco.

### **3.5 Análise por espectroscopia no infravermelho**

Após medir o CMR, as placas foram novamente incubadas até a produção de esporos. Este experimento foi realizado utilizando os fungos que cresceram no ágar Sabouraud na concentração de  $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e as placas que não continham o fármaco. Para coleta de esporos foi padronizada a área de  $1\text{cm}^2$  de cada colônia. A aquisição dos espectros foi realizado em espectrofotômetro Nicolet modelo Magna IR550 com faixa espectral de 500 a  $4000 \text{ cm}^{-1}$  e processados com software OMNIC E.S.P versão 4.1. As amostras foram analisadas por reflexão difusa após dispersão em brometo de potássio (KBr), sendo realizadas 3 replicas para cada amostra.

#### **3.5.1 Tratamento dos dados**

Os espectros de infravermelho foram correlacionados através de ferramentas quimiométricas, tais como, Análise Hierárquica de Grupamentos e Análise por Componentes Principais utilizando o software Pirouette 3.1.

## **3.6 Produção de biomassa por fermentação em fase submersa**

### **3.6.1 Cepas e manutenção**

A cepa de *Aspergillus* sp. selecionada no item 3.4 serviu de inóculo para obtenção de biomassa, através de fermentação em fase submersa, utilizando como substrato o caldo, obtido através da mistura de água e pó de fumo.

A cepa do *Aspergillus* sp., estava condicionado em tubo de ensaio com 5 mL de ágar Sabouraud inclinado, mantida em estufa a 30°C (cultura estoque).

### **3.6.2 Suspensão de esporos**

Estes inóculos foram preparados imediatamente antes do seu uso e obtidos a partir da cultura estoque. Com o auxílio de uma alça metálica, foi retirada uma quantidade de esporos e inoculada em um tubo de ensaio com 10 mL de solução estéril de Tween 80 a 0,02%. Desta suspensão de esporos, foi transferida uma alíquota de 1 mL em um tubo de ensaio com 9 mL da mesma solução de Tween, obtendo a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta foi obtida solução de esporos nas concentrações de  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  e  $1 \times 10^{-5}$  UFC mL<sup>-1</sup>.

### **3.6.3 Determinação de células viáveis (*pour-plate*)**

Para a escolha da concentração de esporos a ser utilizada, realizou-se a técnica de contagem de esporos (*pour-plate*), feita quando é necessário conhecer o número de organismos presentes por volume. A suspensão de esporos foi inoculada em ágar Sabouraud e incubada por 24 horas a 30°C e a concentração utilizada foi de  $1 \times 10^{-4}$  UFC mL<sup>-1</sup>.

### **3.7 Produção de biomassa**

#### **3.7.1 Preparo do substrato**

Para preparação do substrato, foi utilizado resíduo de pó de fumo, obtido em uma indústria fumageira do município de Santa Cruz do Sul. Este foi misturado na proporção de 1:10 (m/v) em água deionizada, em forno micro-ondas sendo aquecido até fervura. Após, foi peneirado e filtrado a vácuo, desprezando a parte sólida.

#### **3.7.2 Cinética de crescimento da biomassa**

Para avaliar a produção de biomassa e o número de dias em que atinge o platô, foram inoculados 21 frascos de 125 mL, onde continha 20 mL de caldo substrato e 5 mL do inóculo de *Aspergillus* na diluição de  $1 \times 10^{-4}$  UFC mL<sup>-1</sup>. A cada 48 horas foram coletadas triplicatas das culturas e foi filtrada em papel filtro previamente seco em estufa a 50°C por 24 horas e tarado para determinação do peso seco. A biomassa foi então pesada e com base na média das triplicatas diárias foi confeccionado o gráfico onde o eixo x representa o tempo e o eixo y representa a biomassa em mg.

### **3.8 Ensaio de biodegradação**

Os *pellets* de biomassa foram produzidos conforme metodologia já descrita e o ensaio foi realizado em escala de bancada, utilizando biomassa viva com e sem esgotamento endógeno.

### 3.8.1 Uso de biomassa sem esgotamento endógeno

Em 3 Erlenmeyers de 250 mL foram introduzidos individualmente 100 mL de solução tampão fosfato de sódio, pH 7,0 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Estes frascos foram autoclavados por 15 minutos a 120°C. A Tabela 2 apresenta os parâmetros do ensaio.

**Tabela 2-** Parâmetros utilizados nos ensaios de biodegradação.

Erlenmayer	Solução tampão (mL)	Concentração de diclofenaco (mg L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g)
1	100	1	20
2	100	1	0
3	100	0	20

Estes frascos foram colocados em um incubador rotatório (*shaker*), em temperatura de 30°C, por 7 dias, sob agitação de 200 rpm, onde foram retiradas alíquotas diárias de 1 mL para acompanhar o processo.

### 3.8.2 Uso de biomassa com esgotamento endógeno

Para consumir as reservas nutricionais que estavam presentes na biomassa e que poderia servir como fonte nutritiva preferencial, os *pellets* (20 g de peso úmido) foram colocados em água estéril, incubados a 30°C e em *shaker* por 48 horas, fazendo a troca da água a cada 24 horas.

## 3.9 Análise de diclofenaco de sódio por HPLC

Na Tabela 3 são apresentados os parâmetros utilizados para análise das amostras em HPLC conforme proposto por Shuchara (2007) com alterações.

**Tabela 3-** Parâmetros de cromatografia líquida utilizados para análise de diclofenaco de sódio.

Parâmetro	Condição
Fase móvel	Acetonitrila e água 50:50
pH	3,0
Volume	20 µL
Vazão	3,0
Comprimento de onda	284 nm

### 3.9.1 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método foram analisadas amostras em 5 concentrações: 05, 10, 15, 25 e 50 mg L<sup>-1</sup>, e após foi confeccionado o gráfico e foi obtida a equação da reta. Todas as análises foram feitas em triplicata.

### 3.9.2 Análise das amostras

Os testes para acompanhar a biodegradação foram feitos utilizando as alíquotas diárias retiradas dos ensaios de biodegradação. Como a concentração inicial destas amostras estava acima daquelas utilizadas no ensaio da linearidade, a mesma foi diluída na concentração de 1:40 em metanol grau HPLC e estas amostras foram injetadas no cromatógrafo.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Seleção da cepa de *Aspergillus* sp.**

Para seleção da cepa de *Aspergillus* sp. resistente ao diclofenaco de sódio, foi utilizado o teste da toxicidade de determinação do CMR.

Foram escolhidos os fungos da espécie *Aspergillus* por serem de crescimento rápido, muito resistentes a compostos tóxicos e amplamente utilizados em estudos de biorremediação.

Os testes foram realizados com as 13 cepas já apresentadas na metodologia e tiveram o objetivo de avaliar qual apresenta o melhor potencial para realização de ensaios de biodegradação do fármaco diclofenaco de sódio.

### **4.2 Ensaio de CMR**

Os ensaios de ecotoxicidade com fungos filamentosos não são diferentes de ensaios de atividade antifúngica e baseiam-se em medidas de citotoxicidade quanto à inibição do crescimento e quanto à indução de morte celular.

Contudo, o objetivo com que foi realizado o teste foi selecionar, dentre as cepas testadas, a que apresentou melhor crescimento em contato com o xenobiótico testado.

#### **4.2.1 CMR em ágar Sabouraud**

Após 24 horas de incubação, foi possível verificar o crescimento em todas as amostras de *Aspergillus* e em todas as concentrações trabalhadas. Em nenhum dos

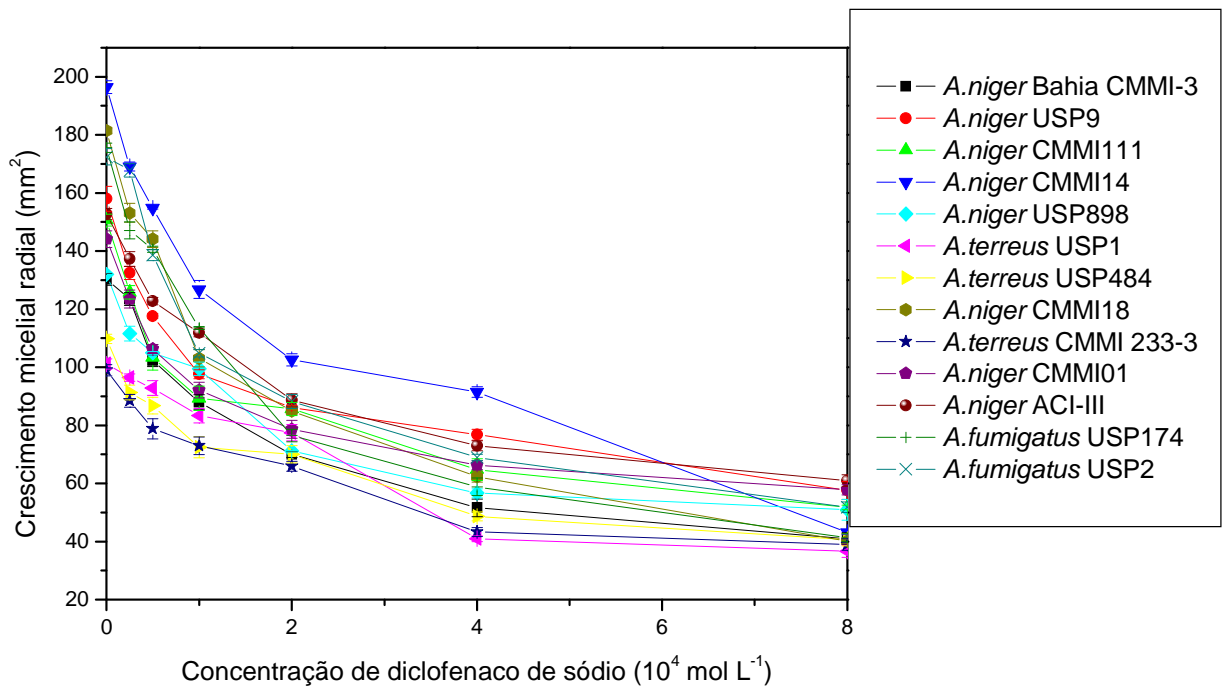


discos inoculados foi observada a ausência de crescimento, indicando que todos se encontravam viáveis e suscetíveis ao efeito do diclofenaco de sódio.

Na Tabela 4, encontram-se as respectivas médias das áreas das colônias de *Aspergillus sp.*, com seus respectivos desvios padrões para cada composto nas 6 concentrações testadas, bem como na solução controle (branco), e utilizando estes resultados é apresentado na Figura 4 as curvas de inibição do crescimento.

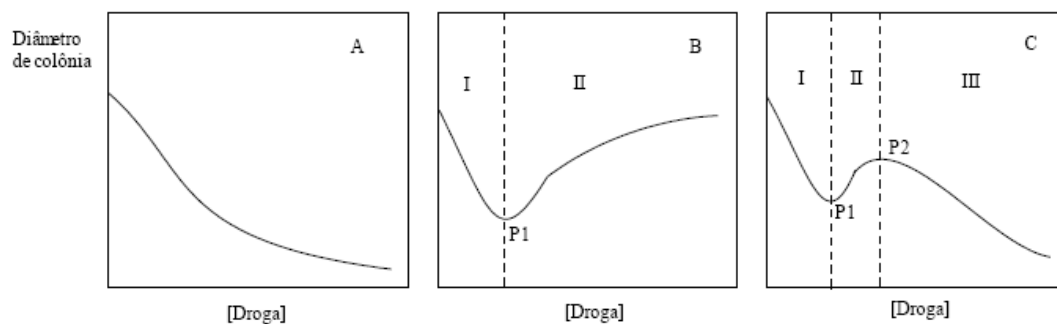
**Tabela 4-** Área das colônias ( $\text{mm}^2$ ) de *Aspergillus sp.* em ágar Sabouraud obtidas com diferentes concentrações de diclofenaco de sódio.

MICROORGANISMO	Concentração de diclofenaco de sódio $\text{molL}^{-1}$						
	Branco	$2,5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-4}$
<i>A.niger Bahia CMMI-3</i>	130,3±2,0	123,5±2,2	102,3±2,1	88,0±2,6	70,0±1,0	51,6±3,0	41,0±2,0
<i>A.niger USP9</i>	158,0±4,3	132,5±2,3	117,7±0,7	97,6±1,5	86,2±0,7	76,8±1,9	57,7±3,0
<i>A.niger CMMI111</i>	150,7±2,0	125,8±2,4	103,5±4,4	89,3±4,2	85,7±2,3	64,8±3,7	51,8±0,7
<i>A.niger CMMI14</i>	196,5±2,2	169,2±1,5	154,8±0,3	126,8±3,1	102,7±2,1	91,5±1,8	43,2±0,8
<i>A.niger USP898</i>	132,0±0,5	111,7±2,6	105,0±0,5	99,5±2,3	71,2±0,3	56,7±1,5	51,0±3,6
<i>A.terreus USP1</i>	101,2±1,7	96,5±1,3	92,8±2,6	83,3±2,5	77,5±2,8	41,0±1,0	36,7±2,1
<i>A.terreus USP484</i>	109,8±1,6	91,3±2,5	86,8±2,8	72,5±3,6	70,0±3,0	48,7±1,5	40,7±2,1
<i>A.niger CMMI18</i>	181,5±0,9	153,2±3,3	144,2±2,8	103,1±3,0	85,0±0,5	62,3±1,9	40,2±0,8
<i>A.terreus CMMI-233-3</i>	99,0±2,0	88,5±2,2	78,9±3,5	73,0±3,0	66,0±1,7	43,3±1,5	39,0±2,0
<i>A.niger CMMI01</i>	144,2±2,8	123,5±3,0	106,3±1,5	92,2±2,7	78,7±3,0	66,3±1,5	57,8±1,7
<i>A.niger ACI-III</i>	152,8±1,9	137,3±2,5	122,8±1,2	111,8±1,3	88,7±2,3	73,0±1,7	61,0±2,0
<i>A.fumigatus USP174</i>	175,7±1,6	147,2±2,9	140,7±1,0	113,6±0,5	76,5±2,1	58,9±3,1	41,4±1,3
<i>A.fumigatus USP2</i>	172,5±2,8	167,8±2,3	138,6±1,9	104,8±1,2	88,3±2,5	68,9±1,0	51,8±1,8



**Figura 4-** Curvas de crescimento micelial radial de cepas de *Aspergillus* sp. em ágar Sabouraud sob diferentes concentrações de diclofenaco de sódio.

Existem três padrões de curvas de atividade antifúngica com o aumento da concentração do composto em estudo: (a) monofásicas, caracterizadas pelo aumento contínuo do crescimento; (b) bifásica, onde atinge um ponto máximo de inibição e após a atividade fungistática decresce ou estaciona; e (c) trifásica, que ocorre um aumento da atividade fungistática até um ponto máximo de inibição do crescimento, seguido por perda momentânea da atividade fungistática até o ponto de mínima atividade terminando por recuperação da atividade (CORBELLINI, RODRIGUES, SCROFERNEKER, 2005). Pode-se observar o comportamento dos padrões de curvas na Figura 5.



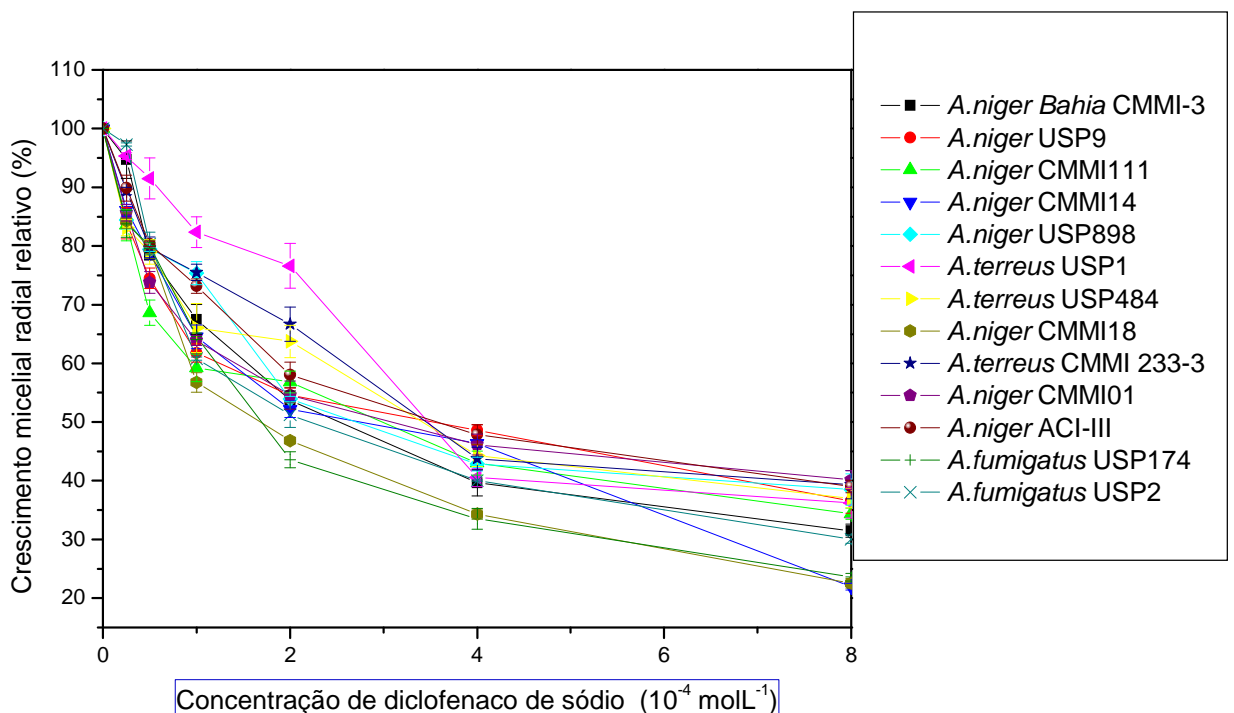
**Figura 5-** Padrões de curvas de atividade fungistática. A = monofásica; B = bifásica e C = trifásica.

Analisando as curvas (Figura 4), referentes ao CMR dos fungos em relação ao fármaco, verificamos que as mesmas indicam um comportamento monofásico, ou seja, há inibição do crescimento das colônias com o aumento da concentração do xenobiótico.

Todas as cepas testadas apresentaram o mesmo comportamento, independente de ser *Aspergillus niger*, *A. fumigatus* ou *A. terreus*.

O fungo que apresentou a maior medida de crescimento na solução controle foi *A. niger* CMMI14, seguido por *A. niger* CMMI18 e *A. fumigatus* USP2, e os fungos que tiveram o menor tamanho da colônia foram os da espécie *A. terreus* CMMI233-3, USP1 e USP484, respectivamente.

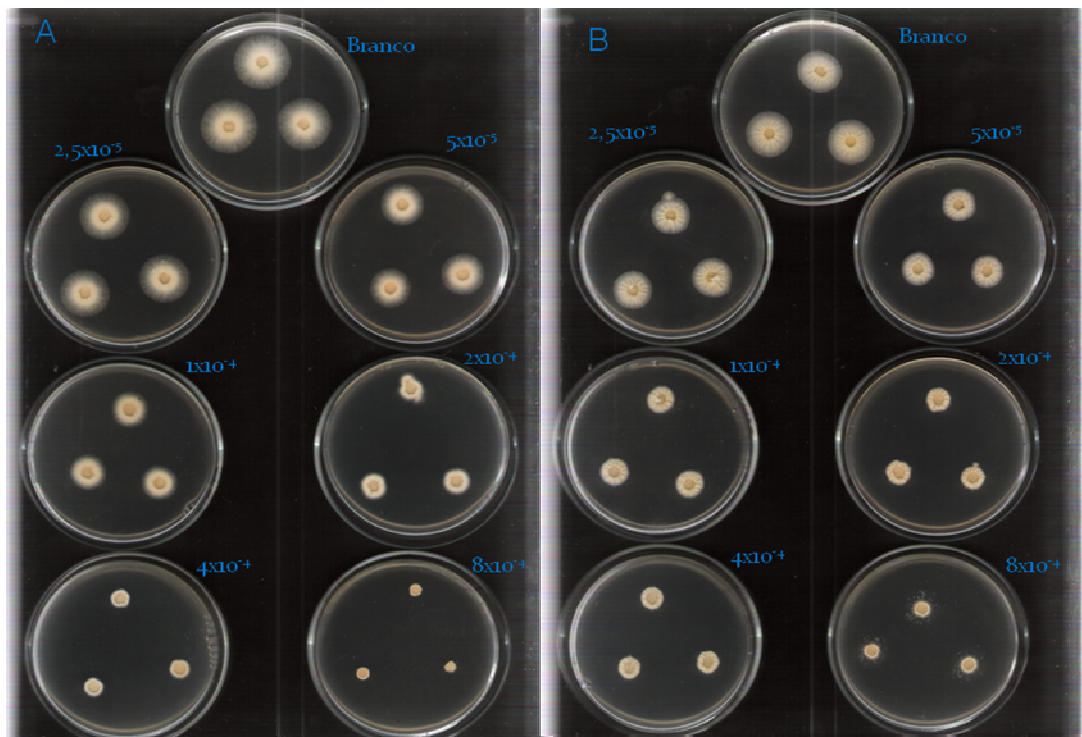
Para melhor representação da toxicidade do diclofenaco, foi confeccionado um gráfico (Figura 6) utilizando os dados da Tabela 4. Estes dados foram transformados para porcentagem, onde os valores da solução controle representam 100% de crescimento, e foram utilizados para analisar em que concentração foi atingida a, concentração mínima capaz de inibir 50% do crescimento ( $MIC_{50}$ ).



**Figura 6-** Curvas de crescimento micelial radial relativo de cepas de *Aspergillus* sp. em ágar Sabouraud sob diferentes concentrações de diclofenaco de sódio

A concentração em que todos os fungos atingiram o  $MIC_{50}$  foi a de  $4 \times 10^{-4}$ . Este resultado é importante porque indica que o diclofenaco apresenta toxicidade

relevante para os fungos testados. O fato dos mesmos terem atingido o MIC<sub>50</sub> indica o potencial antifúngico do fármaco para estas cepas. Na Figura 7 é apresentada a foto do fungo que apresentou maior e menor sensibilidade ao fármaco nas respectivas concentrações trabalhadas.



**Figura 7-** *Aspergillus niger* CMMI14 (A) e *Aspergillus niger* CMMI01(B) em ágar Sabouraud com diferentes concentrações de diclofenaco de sódio.

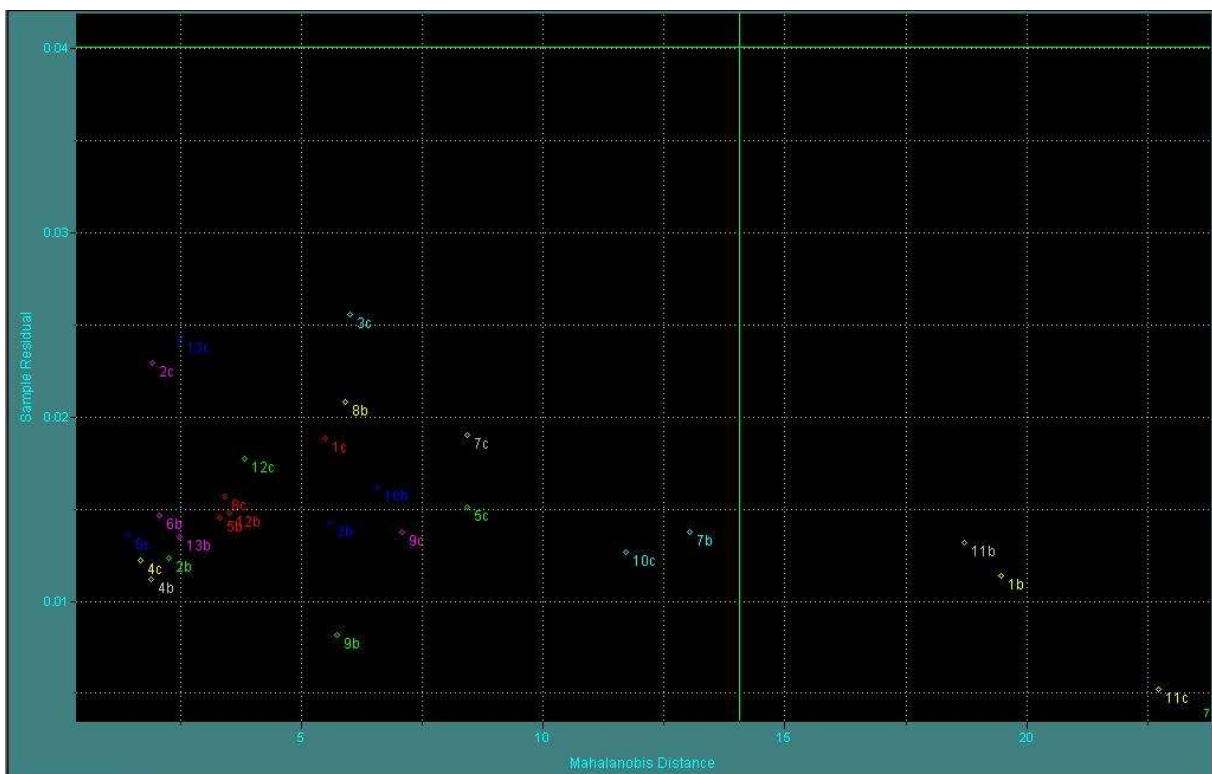
Os fungos que apresentaram menor inibição percentual do CMR foram os *A. niger* CMMI01, ACI-III e USP898 e os que apresentaram maior percentual de inibição foram *A. niger* CMMI14, CMMI18 e *A. fumigatus* USP174. Pode-se observar na Figura 7 que a diferença entre os fungos que tiveram a maior e a menor sensibilidade é muito pequena, indicando que houve um comportamento padrão para todas as 13 cepas de fungos testadas.

A toxicidade do diclofenaco é apontada em diversos estudos onde são utilizados microcrustáceos como *Daphnia magna*, a bactéria marinha *Vibrio fischeri* e algumas espécies de peixes (SCHWAIGER et al., 2004; HONG et al, 2007). No entanto, na literatura não foi encontrado nenhum estudo em que a toxicidade do diclofenaco tivesse sido testada em *Aspergillus* sp., não existindo também estudos indicando a atividade antifúngica do fármaco.

A realização deste teste não possibilitou apontar o fungo com potencial para ser utilizado no processo de biodegradação, pois todas as cepas testadas apresentaram grande sensibilidade ao diclofenaco. Com base nisto, buscou-se utilizar um meio de cultura que estimulasse o fungo a utilizar o fármaco como fonte nutritiva.

Após as medidas dos halos de crescimento, as placas que continham os fungos na concentração de  $4 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e que não continham o fármaco foram levadas para estufa por mais 72 horas para produção de esporos de cada cepa. Estes esporos foram utilizados para análise por espectroscopia no infravermelho para obtenção de suas impressões digitais metabólicas.

Os espectros obtidos a partir destes esporos foram analisados no software Pirouette 3.1 para verificar, através da PCA e HCA, alterações metabólicas dos fungos quando em contato com o fármaco. A Figura 8 apresenta o resultado para a PCA.



**Figura 8-** Gráfico para a Análise por Componentes Principais dos espectros dos esporos de cepas de *Aspergillus* sp. com e sem diclofenaco de sódio.

As análises foram realizadas em diferentes faixas do espectro, e em nenhuma faixa espectral pode-se avaliar a formação dos grupos, não sendo possível

identificar neste experimento alterações metabólicas dos fungos em contato com o fármaco. Observa-se no gráfico que não houve a formação de grupos, ou seja, a separação dos fungos da solução controle dos fungos que cresceram em contato com o diclofenaco.

#### 4.2.2 CMR em ágar Winogradsky

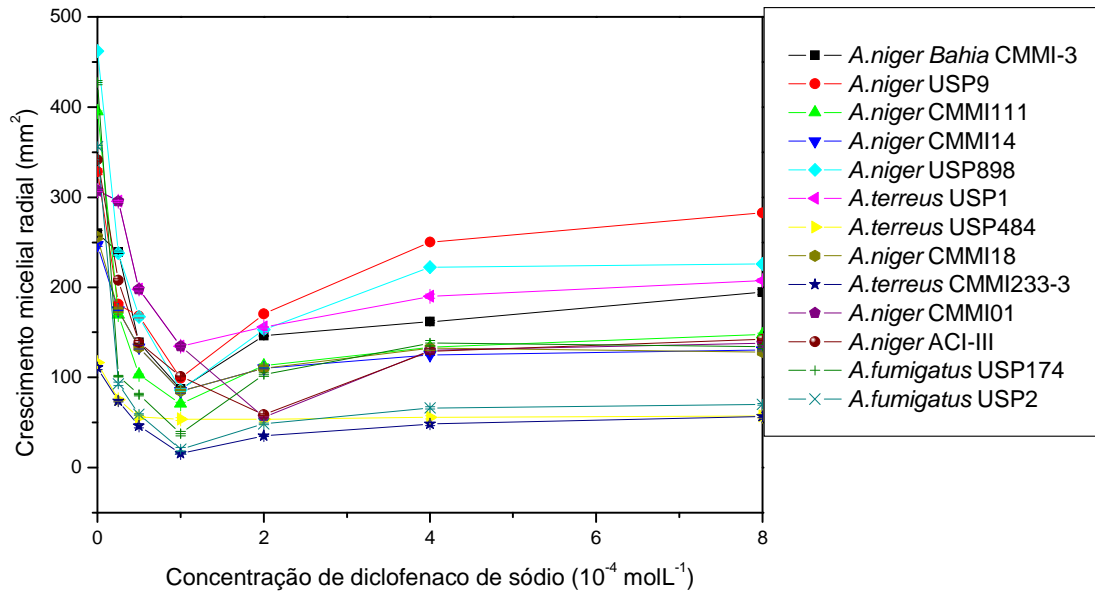
Na Tabela 5, encontram-se as respectivas médias das áreas das colônias de *Aspergillus* sp., com seus respectivos desvios padrões para cada composto nas seis concentrações testadas, bem como na solução controle (branco). A representação destes valores pode-se visualizar na Figura 9 onde estes valores estão representados pela curva de inibição do crescimento.

**Tabela 5-** Área das colônias ( $\text{mm}^2$ ) de *Aspergillus* sp. em ágar Winogradsky obtidas com diferentes concentrações de diclofenaco de sódio.

MICROORGANISMO	Concentração de diclofenaco de sódio molL <sup>-1</sup>						
	Branco	$2,5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-4}$
<i>A. niger</i> Bahia CMMI-3	260,2±2,8	239,0±1,5	138,9±1,8	87,1±2,5	146,3±0,5	161,7±1,2	194,6±2,9
<i>A. niger</i> USP9	328,2±3,2	181,3±1,8	168,0±2,2	99,1±1,0	170,5±2,3	250,3±0,8	282,5±1,1
<i>A. niger</i> CMMI111	394,9±0,8	169,5±1,2	103,0±0,9	70,8±1,8	113,0±2,0	133,4±1,6	147,7±1,3
<i>A. niger</i> CMMI14	246,9±1,4	174,4±0,4	133,6±2,3	84,9±2,2	110,4±1,2	125,0±0,9	130,5±1,0
<i>A. niger</i> USP898	462,4±0,5	238,1±2,5	167,3±2,3	86,0±1,4	153,2±2,1	222,4±0,9	225,8±1,3
<i>A. terreus</i> USP1	307,4±1,2	295,6±0,9	198,0±1,8	134,7±1,4	155,9±0,4	190,0±2,3	207,5±2,1
<i>Terreus</i> USP484	116,3±0,9	75,4±1,8	55,8±2,0	53,7±1,6	53,8±3,2	55,7±1,8	57,3±2,2
<i>A. niger</i> CMMI18	256,0±2,0	174,4±1,6	133,6±3,2	84,9±1,5	110,4±1,8	132,5±2,5	128,2±0,9
<i>A. terreus</i> CMMI233-3	111,0±2,2	73,8±1,0	46,1±2,3	15,6±0,8	35,2±0,9	48,1±1,8	56,8±1,4
<i>A. niger</i> CMMI01	307,4±1,8	295,6±2,5	198,0±0,9	134,7±1,2	55,9±0,9	130,0±1,8	138,0±1,6
<i>A. niger</i> ACI-III	341,6±1,5	207,8±1,8	138,7±2,5	101,0±0,5	58,6±1,2	129,0±2,9	142,5±0,8
<i>A. fumigatus</i> USP174	427,3±2,3	101,3±1,0	81,0±1,6	37,8±2,4	103,0±1,9	138,2±3,1	134,2±1,9
<i>A. fumigatus</i> USP2	356,0±1,4	92,8±2,1	58,9±0,9	20,3±1,9	48,6±0,9	66,1±1,2	70,3±0,9

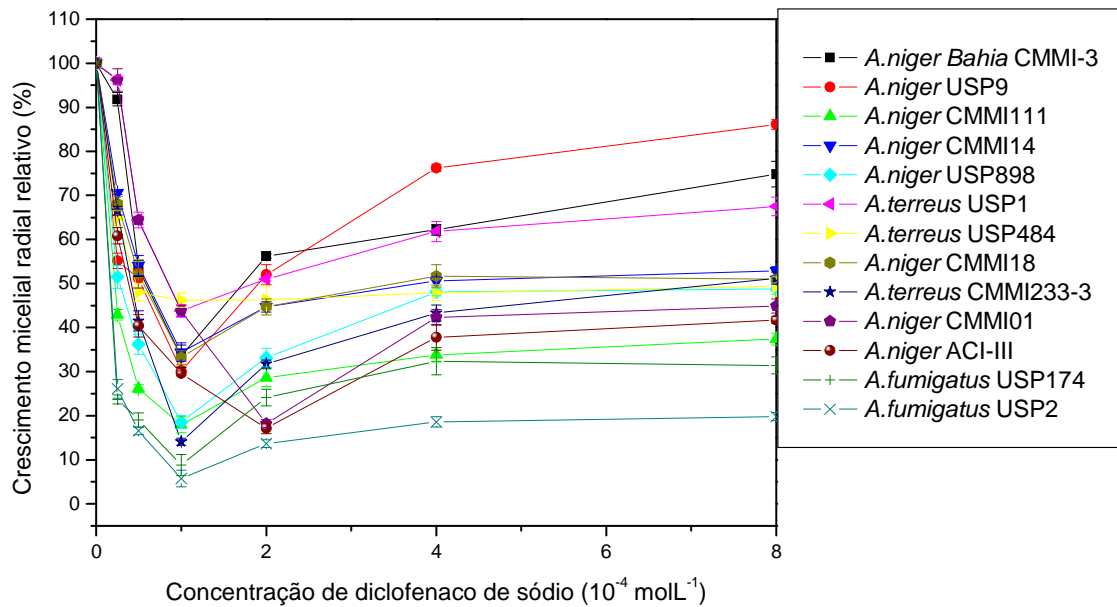
Foi utilizado o mesmo teste de CMR da metodologia com o ágar Sabouraud, porém utilizando um meio pouco nutritivo que é o Winogradsky. Este teste buscou estimular o fungo a utilizar o fármaco como fonte nutritiva.

Após 48 horas de incubação, foi possível verificar o crescimento em todas as amostras de *Aspergillus* e em todas as concentrações trabalhadas. Em nenhum dos discos inoculados foi observada a ausência de crescimento, indicando que todos se encontravam viáveis e suscetíveis ao efeito do diclofenaco de sódio.



**FIGURA 9-** Curvas de crescimento micelial radial de cepas de *Aspergillus* em ágar Winogradsky sob diferentes concentrações de diclofenaco de sódio.

Na Figura 10 os dados da Tabela 5 foram transformados para porcentagem, onde os valores da solução controle representam 100% de crescimento.



**FIGURA 10-** Curvas de crescimento micelial radial relativo de cepas de *Aspergillus* sp. em ágar Winogradsky sob diferentes concentrações de diclofenaco de sódio.

As Figuras 9 e 10 seguem um modelo de crescimento de curva dose-resposta bifásico. Elas iniciam com uma inibição e com o aumento da dose diminui a inibição. Neste modelo de curva bifásico, ocorre uma adaptação do crescimento microbiano por indução de enzimas relacionadas com a assimilação ou a biodegradação de substratos que podem fornecer carbono e nitrogênio como nutrientes para material plástico intracelular.

Dentre todos os fungos testados apresentados na Figura 10, o que apresentou a maior área de crescimento foi *A. niger* USP9 seguido por *A. niger* Bahia CMMI-3 e *A. terreus* USP1 e os de menor crescimento foram *A. fumigatus* USP2, *A. fumigatus* USP174 e *A. niger* CMMI111, respectivamente.

Quando correlacionado o crescimento na solução mais concentrada com o crescimento na solução controle, a cepa que apresenta uma maior recuperação foi *A. niger* USP9.

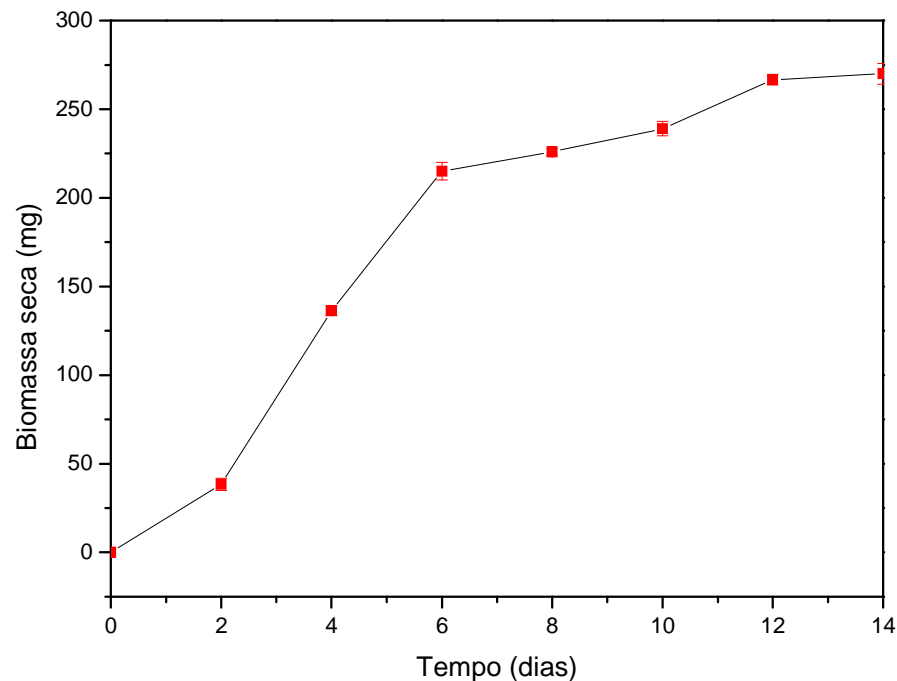
Com a análise dos dois gráficos a cepa fúngica selecionada para os ensaios de biodegradação foi *A. niger* USP9, que mostrou uma adaptação ao xenobiótico, indicando que poderia estar biodegradando a molécula de diclofenaco como fonte de carbono e nitrogênio em maior intensidade que as demais cepas.

## **4.2 Produção de biomassa de *Aspergillus niger* USP9**

Inicialmente foi feita a produção de biomassa para avaliar o crescimento e o tempo necessário para atingir a fase platô. A Tabela 6 apresenta os resultados para o crescimento diário da biomassa do fungo *A. niger* USP9 em preparado de pó de fumo, fonte natural que serviu de substrato para o seu crescimento, a escolha deste substrato deve-se à grande concentração de indústrias fumageiras no município o que leva a abundância deste resíduo.

Na Figura 11 está representado o gráfico da produção de biomassa nos respectivos dias de incubação.





**Figura 11-** Produção de biomassa de *Aspergillus niger* USP9 em extrato de pó de fumo.

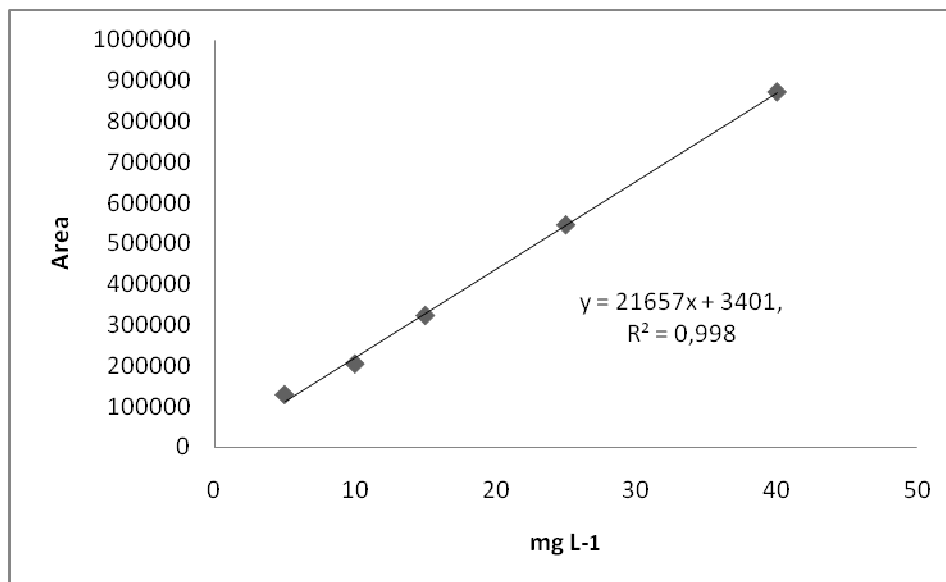
A Figura 11 apresenta com clareza as fases do crescimento microbiano: fase lag, fase exponencial e fase estacionária. Para realização dos ensaios optou-se utilizar a biomassa produzida até o sexto dia pelo fato da cepa estar em fase de crescimento exponencial. Segundo Madigan, Martinko & Parker (2004), as células em crescimento exponencial geralmente encontram-se em condições mais saudáveis, sendo, por este motivo, geralmente utilizadas em estudos enzimáticos ou de outros componentes celulares. Pointing (2001) relata que os fungos, principalmente na *fase lag* são bons produtores de enzimas peroxidases (lignina peroxidases, manganês peroxidase), e também enzimas como azorredutase, celulase, lipase, laccases, etc., que são amplamente utilizadas para catálise de vários contaminantes ambientais dependendo de sua natureza química.

Outro motivo relevante é que no final do ensaio que teve duração de sete dias os microrganismos não estariam em fase de morte celular, desde que satisfeitas as suas condições de cultivo.

### 4.3 Quantificação dos teores de diclofenaco de sódio

Para quantificação dos teores do fármaco, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), onde o tempo de retenção do diclofenaco foi de aproximadamente 14 minutos, apresentando um pico homogêneo e simétrico. Para testar a linearidade do método foi elaborada uma curva analítica com 5 pontos: nas concentrações de 5, 10, 15, 25, 40 mgL<sup>-1</sup>.

Sabe-se que linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados (sinal analítico) que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. Os resultados obtidos são usados para obter uma reta por regressão com relação ao cálculo de analito, usando o método de mínimos quadrados. Para o estudo da linearidade faz se necessário a obtenção de uma curva resposta sendo o eixo x, a concentração e o eixo y a resposta obtida:  $y = ax+b$ , onde a é o coeficiente angular e b o coeficiente linear. A seguir está representada a curva e a respectiva equação da reta.



**Figura 12-** Curva analítica de diclofenaco de sódio para HPLC.

Foi observada boa linearidade para a metodologia com coeficiente de correlação acima de 0,99, dentro da faixa estudada. A resolução n.º 899 (Brasil, 2003; RIBANI et al, 2005) preconiza que o valor de ( $R^2$ ), deve ser de no mínimo 0,99, indicando então que o método estudado é linear.

#### 4.4 Ensaios de biodegradação

Os ensaios de biodegradação ocorreram em um período de sete dias sendo que foram recolhidas alíquotas diárias, para acompanhar o ensaio de biodegradação. A concentração de diclofenaco utilizada para os ensaios foi de 1 mg mL<sup>-1</sup>, em 100 mL de solução tampão pH 7,0.

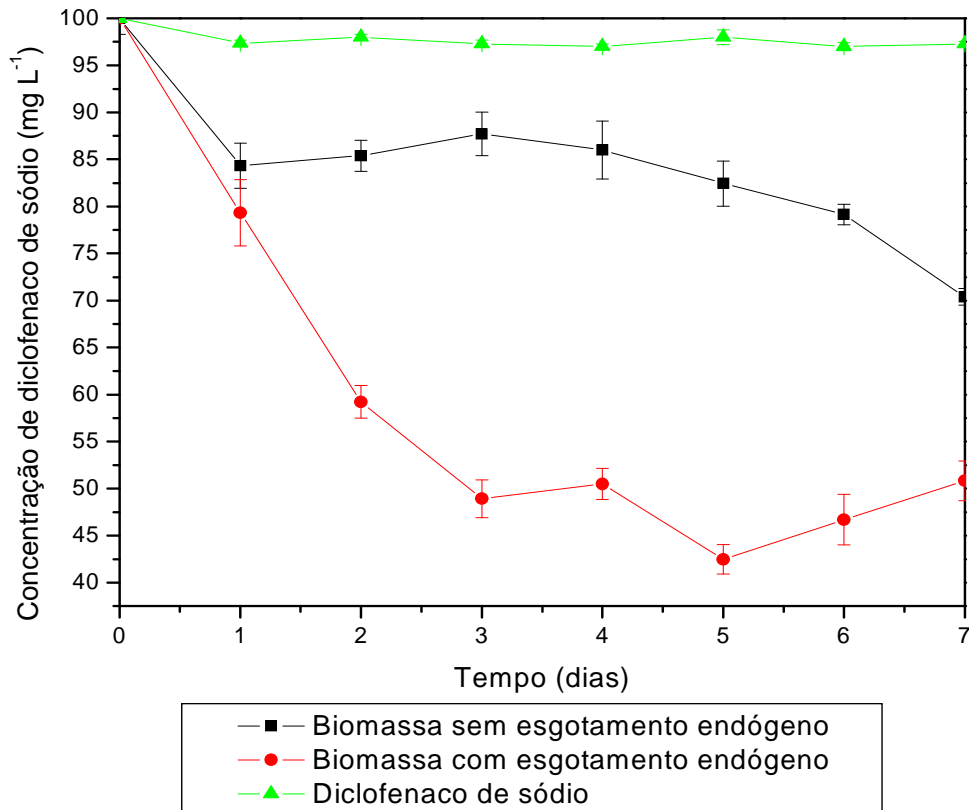
Os ensaios foram realizados utilizando 20 g (peso úmido) da biomassa do fungo *A. niger* USP9. Os testes utilizando a biomassa apenas lavada em água estéril (BSE) e com a biomassa com esgotamento endógeno (BCE), os testes foram realizados simultaneamente, assim como, para avaliar qualquer degradação natural do fármaco foi realizado o mesmo ensaio sem a biomassa sob as mesmas condições.

A Tabela 7 apresenta os resultados das análises das alíquotas diárias recolhidas das amostras com e sem esgotamento e também dos ensaios realizados sem a biomassa.

**Tabela 7-** Concentração de diclofenaco de sódio presente na solução aquosa nos ensaios de biodegradação utilizando *Aspergillus niger* USP9.

Dias	Biomassa sem esgotamento (%)	Biomassa com esgotamento (%)	Diclofenaco sem biomassa
0	100,0±0	100,0±0	100,0±0
1	84,3±2,4	79,3±3,5	97,4±0,3
2	85,4±1,7	59,2±1,7	98,0±1,5
3	87,7±2,3	48,9±2,0	97,3±2,7
4	86,0±3,1	50,5±1,6	97,0±0,8
5	82,4±2,4	42,5±1,5	98,2±0,9
6	79,1±1,1	46,7±2,7	97,1±1,4
7	70,4±0,9	50,8±2,1	98,3±2,0

Através dos resultados da Tabela 7 foi confeccionado o gráfico representativo com os valores da concentração do diclofenaco de sódio *versus* o tempo (dias) de duração dos ensaios.



**Figura 13-** Concentração residual de diclofenaco de sódio nos sete dias do ensaio de biodegradação com biomassa de *Aspergillus niger* USP9 com esgotamento endógeno, sem esgotamento endógeno e somente o fármaco.

Analisando os dados referentes à concentração de diclofenaco de sódio em cada um dos sete dias do ensaio verificou-se que no primeiro dia de ensaio houve o consumo do fármaco, sendo que, quando foi realizado com a BCE o consumo foi maior quando comparado ao ensaio com a BSE (20,7% e 15,7%, respectivamente). Esta diferença provavelmente esteja associada ao período de adaptação. Isso porque a BCE já havia ficado por 48 horas em água destilada estéril enquanto na BSE em seu interior ainda restava caldo do pó de fumo, que foi o substrato utilizado para produzir os *pellets* de biomassa.

Esta fase de adaptação era esperada, pois quando há uma mudança nas condições de cultivo o que de fato aconteceu, mesmo anteriormente estando em fase exponencial, as células entrarão em *fase lag* novamente. Isso acontece também quando as células são expostas a compostos químicos ou tóxicos (MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2004). Após esta fase de adaptação o fungo conseguiu utilizar o fármaco como fonte nutricional e no decorrer dos dias do ensaio o consumo continuou a aumentar chegando ao máximo de 57% no quinto dia com a BCE e de 29,6% no sétimo daí quando utilizada a BSE. Durante os sete dias em ambos os ensaios houve intervalos em que a concentração diminuiu em um dia e aumentou em outro, podendo este resultado ser atribuído à biossorção do fármaco pela biomassa e com a agitação a liberação novamente para o meio.

Outro dado importante que foi verificado no gráfico é de que no decorrer do período de sete dias do ensaio não houve alteração na concentração do diclofenaco no ensaio que continha o fármaco sem a biomassa. Alguns autores citam que o diclofenaco sofre degradação através de fotoxidação quando expostos à radiação solar, e que em testes feitos em um lago a taxa de fotodegradação chegou a 90% (BUSER, POIGER, MÜLLER, 1998). No caso aqui em estudo, entretanto, as análises destes resultados indicaram de forma conclusiva que os resultados não foram alterados por qualquer degradação natural do fármaco durante a realização do ensaio nas condições testadas.

Os resultados para remoção do diclofenaco em ETE são contraditórios variando de 0 a 80%, mas a média fica em torno de 21-40% (ZHANG, GEISSEN, GAL, 2008). Os resultados deste trabalho obtidos para o consumo do diclofenaco de sódio se comparados com a literatura são superiores porque na maioria dos trabalhos a concentração de diclofenaco utilizada é bem menor,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (MARCO-URREA et al. 2010), enquanto que neste trabalho a concentração foi de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Apesar de evidências da transformação do diclofenaco por comunidades microbianas serem escassas na literatura, sabe-se que a biodegradação do mesmo através de tratamento com lodos ativados em ETE é muito limitada (Quintana, WEISS, REEMTSMA, 2005) não encontraram degradação deste fármaco na concentração de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  após 28 dias, nem quando ele era a única fonte de carbono, nem quando foi adicionada uma fonte externa de carbono para tentar conseguir a co-degradação metabólica. Estes resultados são semelhantes ao estudo realizado a curto prazo em uma estação de tratamento de esgoto piloto, onde

após 55 horas de tratamento, com uma concentração inicial de  $10 \mu\text{gL}^{-1}$  de diclofenaco não foi encontrado nenhuma degradação (ZWIENER, FRIMMEL, 2003). Estes resultados indicam que esta ineficiência dos sistemas de lodos ativados e biorreatores de membrana colaboram para a persistência do fármaco no meio ambiente.

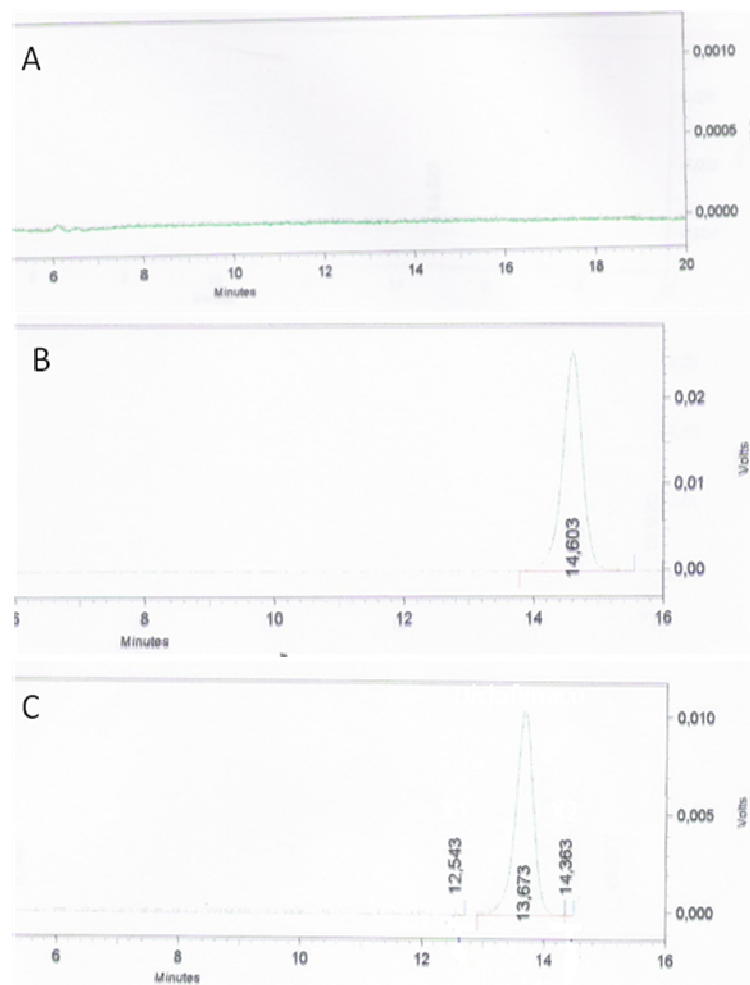
Por outro lado, alguns trabalhos a exemplo deste, têm obtido êxito na remoção do diclofenaco através de microrganismos. Utilizando bactérias presentes em filtros de carvão, inoculados em solução de diclofenaco na concentração de  $0,30 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Minillo et. al. (2009) relataram que após 77 dias houve 100% de consumo do fármaco, no entanto quando analisados as amostras sem o inóculo para verificar a degradação natural do fármaco foi registrado o consumo de 57%.

Em um estudo com metodologia semelhante à utilizada neste trabalho, foram utilizado *pellets* do fungo *Trametes versicolor*, onde foi verificada a remoção de 94% de diclofenaco ( $10 \text{mgL}^{-1}$ ) na primeira hora de incubação e após quatro horas o fármaco não foi detectado na solução em estudo. Neste mesmo experimento os autores testaram a capacidade de biossorção da biomassa autoclavada, onde constataram a remoção de 47% do fármaco (MARCO-URREA et. al 2010). Estes resultados referentes à biossorção podem não ser totalmente representativos para a biomassa viva, pois, é conhecido que as células fúngicas da biomassa quando expostas ao tratamento com calor sofrem alterações físico-químicas, aumentando a capacidade de biossorção quando comparada com células vivas, dependendo do poluente (ARICA et al. 2003). No entanto, a biossorção existiu, e a exemplo da biomassa de *T. versicolor*, parte do consumo do diclofenaco pelo *A. niger* USP9 pode ser por biossorção.

Os resultados encontrados neste experimento para a biodegradação do diclofenaco por *Aspergillus niger* USP9, são bem mais eficientes que os dados encontrados na literatura, pois a concentração utilizada no estudo é relativamente alta se comparadas às encontradas no ambiente aquático. Os resultados podem ser comparados com métodos químicos e físico-químicos geralmente utilizados no tratamento de efluentes como, por exemplo, os processos oxidativos avançados (POA's). Tratamento de efluentes contendo diclofenaco de  $200 \text{mgL}^{-1}$  com esta tecnologia obtiveram a sua degradação de 99,4% em 2 horas (ROCHA et. al, 2009). Assim como o tratamento utilizando a ozonização levou á rápida degradação do diclofenaco na concentração de  $300 \text{mgL}^{-1}$  (COELHO, 2008). Esta comparação é

importante, pois exemplifica o quão eficiente foi a remoção do diclofenaco pelo fungo com relação à concentração do fármaco.

Durante as análises das alíquotas diárias retiradas dos ensaios de biodegradação por HPLC, foi avaliada de forma qualitativa a formação de subprodutos do diclofenaco através da comparação dos cromatogramas das amostras dos ensaios com a BCE, BSE, fármaco sem a biomassa e da biomassa em solução sem o diclofenaco (Figura 14).



**Figura 14-** Cromatogramas do quarto dia de ensaio de consumo de diclofenaco de sódio por biomassa de *Aspergillus niger* USP9. A = Biomassa sem o fármaco; B = Fármaco sem a biomassa e C = Biomassa com esgotamento endógeno.

Foi verificada a formação de dois sinais cromatográficos diferentes do referente ao fármaco. Nos dois ensaios com BSE e BCE foi verificada a formação de subprodutos em quase todos os dias, com exceção do tempo zero em ambos os

ensaios, no sétimo dia do ensaio com BSE e no quinto e sexto dia quando utilizado BCE.

Comparando estes cromatogramas é possível identificar, de forma qualitativa, dois subprodutos. É importante salientar que estes cromatogramas são do comprimento de onda de 284 nm, não podendo afirmar que não exista mais subprodutos. Para isso, as amostras deveriam ser analisadas em diferentes comprimentos de onda. Também não foi possível identificar quais são esses metabólitos com o uso do HPLC, a identificação dependeria de outras ferramentas analíticas como Espectrometria de Massas.

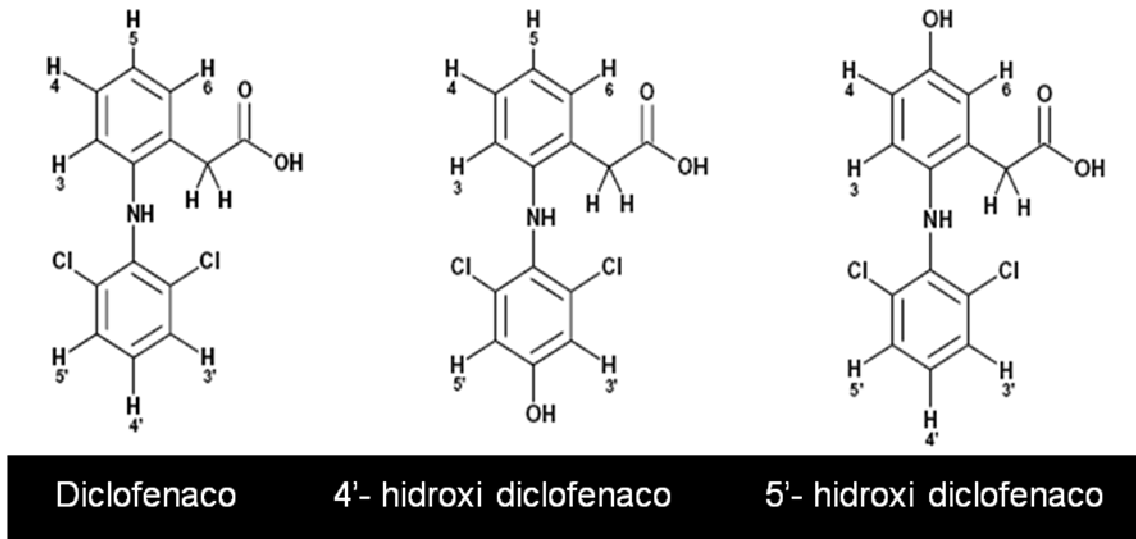
O metabolismo do diclofenaco em humanos e animais é bem estudado. O diclofenaco sofre biotransformação por citocromo P450 gerando metabólitos como o 4-hidroxi e 5-hidroxi-diclofenaco e outros metabólitos em menor concentração como: 3-hidróxi-4-metoxi e 4,5-di-hidroxi diclofenaco (SPARIDANS et. al, 2008).

Alguns metabólitos são descritos sobre a formação de subprodutos durante a degradação do diclofenaco por sistemas biológicos. No ambiente, verificou-se a formação do 5-hidroxi-diclofenaco e do 4-hidroxi-diclofenaco durante a degradação do diclofenaco por microrganismos selvagens de sedimentos de um rio, sendo o primeiro em maior quantidade (GRÖNING et. al, 2007). Webster et al, (1998) descreveram a produção do 4-hidroxi-diclofenaco e pequena quantidade do 3-hidroxi-diclofenaco utilizando fungos filamentosos.

Durantes os testes para biodegradação do diclofenaco utilizando *pellets* de *T. versicolor* foram identificados através de ressonância magnética (RMN) os metabólitos 4-hidroxi-diclofenaco e 5-hidroxi-diclofenaco (GRÖNING et. al, 2007). Com a preocupação de avaliar um possível aumento da toxicidade pela formação destes metabolitos, os autores realizaram o teste de ecotoxicidade pelo bioensaio com MICROTOX®, onde concluíram que a formação destes metabólitos não aumentou a toxicidade inicial.

Na Figura 15 é apresentada a fórmula estrutural dos principais metabólitos, descritos na literatura durante a microbial transformação do diclofenaco.





**Figura 15-** Fórmula estrutural do diclofenaco e de dois de seus metabólitos: 4-hidroxi-diclofenaco e 5-hidroxi-diclofenaco.

Marco-Urrea et al. (2010), apontam que há evidências de que a enzima envolvida na transformação do diclofenaco é a laccase. Laccases geralmente catalisam a remoção do átomo de hidrogênio para formação de grupos OH, porém estes resultados não são conclusivos e indicam que mais estudos devem ser realizados para indicar quais outras enzimas estão envolvidas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os objetivos propostos para o desenvolvimento da parte experimental e analisando os resultados obtidos, pode-se dizer que eles foram obtidos satisfatoriamente.

Inicialmente, quando foram realizados os testes para seleção de um fungo através do teste da toxicidade por inibição do CMR com potencial para tratar resíduos do diclofenaco de sódio em ambientes aquáticos, não era esperada a sua toxicidade em fungos, com base na literatura revisada. No entanto, quando o mesmo teste foi realizado em um ágar pobre em nutrientes na tentativa de “forçar” o fungo em consumir o fármaco foi possível selecionar o fungo *A. niger* USP9 que apresentou a menor sensibilidade ao fármaco.

Outro fator importante deste estudo foi o uso de resíduos para produzir a biomassa para os testes de biodegradação. Neste caso foi utilizado resíduo de fumo, mas outros resíduos podem ser testados para o mesmo fim.

O uso do HPLC para as análises do fármaco durante os ensaios de biodegradação foi adequada e permitiu detectar a formação de possíveis produtos de biotransformação pela cepa de *Aspergillus* selecionada.

Os resultados dos ensaios de biodegradação utilizando biomassa do fungo foram satisfatórios, pois, apesar de não ter conseguido a remoção de todo o fármaco, a concentração do mesmo no meio é bem superior a encontrada no ambiente aquático, indicando que o fungo pode ser utilizado para o tratamento de efluentes domésticos e industriais.

## 6 TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a atividade antifúngica do diclofenaco de sódio;
  - Avaliar a bioadsorção da biomassa de *Aspergillus sp.* em efluentes com diclofenaco;
  - Identificar os metabólitos formados durante o processo de biodegradação do diclofenaco pelo fungo *A. niger* USP9.
  - Otimizar a metodologia utilizando a co-degradação e a inibição ou ativação da enzima P 450.
- Avaliar o uso de outros resíduos naturais como, folhas, serragem, entre outros para a produção de biomassa de fungos para a biodegradação de diclofenaco de sódio.

## 7 REFERÊNCIAS

AGÜERA, A.; PEREZ- ESTRADA, L.A; FERRER, I.; THURMAN, E.M.; MALATO, S.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Application of time-of-flight mass spectrometry to the analysis of phototransformation products of diclofenac in water under natural sunlight. *Journal of Mass Spectrometry*, 40:908-915, 2005.

ARICA, M.Y.; ARPA, C.; KAYA, B.; BEKTAS, S.; DENIZLI, A.; GENÇ, Ö. Comparative biosorption of mercuric ions from aquatic systems by immobilized live and heat-inactivated *Trametes versicolor* and *Pleurotus sajur-caju*. *Bioresource Technology*, 89(2):145-154, 2003.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Paulo: Editora Intertox, 2003.

BARTELS, P.; VON TÜMPLING Jr, W. Solar radiation influence on the decomposition process of diclofenac in surface waters. *Science of the Total Environment*, 374(1):143-155, 2007.

BHALERAO, T.S.; PURANIK, P.R. Microbial degradation of monocrotophos by *Aspergillus oryzae*. *International Biodegradation and Biodegradation*, 63(4):503-508, 2009.

BILA, D.; MONTALVÃO, A.F.; AZEVEDO, D.A.; DEZOTTI, M. Estrogenic activity removal of 17 $\beta$ -estradiol by ozonation and identification of by-products. *Chemosphere*, 69(5):736-746, 2007.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, 36(4):523-530, 2003.

BRASIL. Resolução RE n.º 899, de 29 de maio de 2003 . A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova guia para validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br> ..Acesso em: 10 de junho de 2007.

BUSER, H.-R.; POIGER, T.; MÜLLER, M.D. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environmental Science and Technology*, 32(22):3449-3456, 1998.

CHERNICHARO, C.A.L. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Volume 5: Reatores anaeróbios. DESA/UFMG, Belo Horizonte, 245p, 1997.

CHRISTENSEN, F.M. Pharmaceuticals in the environment. A human risk? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 28(3):212-221, 1998.

CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 142(3):185-194, 2003.

COELHO, A.D. Degradação dos anti-inflamatórios diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno por ozonização. Tese de Doutorado em Engenharia Química, UFRJ, 2008.

COLLA, L.M.; PRIMAZ, A.L.; BERTOLIN, T.E. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazinicos. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 32(3):809-813, 2008.

COOPER, E.R.; SIEWICKI, T.C.; PHILLIPS, K. Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Science of The Total Environment*, 398(1-3):26-33, 2008.

CORBELLINI, A.V.; RODRIGUES, L.M.; SCROFERNEKER, M.L. Correlação quantitativa entre estrutura e atividade antifúngica de fenóis sobre *Aspergillus niger* CMMI 111. *Tecnologia*, 9(2):69-85, 2005.

COUTO, S.R. Stimulation of ligninolytic enzyme production and the ability to decolourise Poly R-478 in semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Environmental Science Technology*, 74(2):159-164, 2000.

CUNHA, C.D. Avaliação da biodegradação de gasolina em solo. Dissertação de mestrado, Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, 1996.

DAUGHTON, C.G. Environmental stewardship and drugs as pollutants. *The Lancet*, 360(9339):1035-1036, 2002.

FENT, K.; WESTON, A.A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2):122-159, 2006.

FERNICOLA, N.A.G.G.; OLIVEIRA, S. (Coord.) Poluentes orgânicos persistentes (POPs). Série Cadernos de Referências Ambiental. CRA, Salvador, v.13, 500p, 2002.

FERREIRA, M.M.C.; MONTANARI, C.A.; GAUDIO, A.C. Seleção de variáveis em QSAR. *Química Nova*, 25(3):439-448, 2002.

GOSWAMI, S.; VIG, K.; SINGH, D.K. Biodegradation of alpha e beta- endosulfan by *Aspergillus sydoni*. *Chemosphere*, 75(7):883-888, 2009.

GRÖNING, J.; HELD, C.; GARTEN, C.; CLAUSNITZER, U.; KASCHABEK, S.R.; SCHLÖMANN, M. Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere* 69(4):509-516, 2007.

HALLING-SÖRENSEN, B.; NIELSEN, S.N.; LANZKY, P.F.; INGERSLEV, F.; HOLTEN LUTZHÖFT, H.C; JÖRGENSEN, S.E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substance in the environmental- A Review. *Chemosphere*. 36(2):357-393, 1998.

HEBERER, T. Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology Letters*. 131(1-2):5-17, 2002.

HERNÁNDEZ, F.; SANCHO, J.V.; IBÁÑEZ, M.; GUERRERO, C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(6):466-485, 2007.

HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K.L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 225(1-2):109-118, 1999.

HONG, H.N., KIM, H.N., PARK, K.S., LEE, S.K.; GU, M.B. Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Chemosphere*, 67(11):2115-2121, 2007.

JONES, L.R.; OWEN, S.A.; HORREL, P.; BURNS, R.G. Bacterial inoculation of granular activated carbon filters for the removal of atrazine from surface water. *Water Research*, 32(8):2542-2549, 1998.

KANSIS, M., BILLMAN-JACOB, H.; McNAUGHTON, D. Quantitative determination of the biodegradable polymer poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid- infrared spectroscopy and multivariate statistics. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8):3415- 3420, 2000.

KNACKER, T. Preliminary environmental risk assessment for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). Envirpharma conference, Lyon, France, 2003.

KOROLKOVAS, A. Dicionário Terapêutico. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

KOT-WASIK, K.; DEBSKA, J.; NAMIES'NIK, J. Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(6):557-568, 2006.

KOUTSOUBA, V.; HEBERER, T.; FUHRMANN, B.; SCHMIDT-BAUMLER, K., TSIPI, D.; HISKIA, A. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography mass spectrometry. *Chemosphere*, 51(2):69-75, 2003.

LIN, M.; AL-HOLY, M.; CHANG, S.-S.; HUANG, Y., CAVINATO, A.G.; KANG, D.-H.; RASCO, B.A. Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3):369-376, 2005.

MADIGAN T.M., MARTINKO, M.J., PARKER, J. Microbiologia de Brock, Ed. 10, São Paulo:Editora Prentice-Hall, 2004.

MARCO-URREA, E., PÉREZ-TRUJILLO, M.; CRUZ-MORATÓ, C.; CAMINAL, G.; VICENT, T. Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3):836-842, 2010.

McEVOY, G.K.; SNOW, E.K.; MILLER, J.; KESTER, L.; WELSH, O.H. AHFS Drug Information. Bethesda: American Society of Hospital Pharmacists, 2009.

MELLO-DA-SILVA, C.A.; FRUCHTENGARTEN, L. Riscos químicos ambientais à saúde da criança. *Jornal de Pediatria*, 81(5 Supl):S205-S211, 2005.

MILLS, L.J.; CHICHESTER, C. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the Total Environment*, 343(1-3):1-34, 2005.

MINILLO, A.; ISIQUE, W.D.; PRADO, H.F.A.; TANGERINO, E.P. Biodegradação de fármacos na água por microrganismos associados em filtros biológicos de carvão. SABESP, DAE 179:42-49, 2009.

NAKADA, N.; SHINOHARA, H.; MURATA, A.; KIRI, K.; MANAGAKI, S.; SATO, N.; TAKADA, H. Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemical (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Research*, 41(19):4373-4382, 2007.



NAUMANN, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry, Meyers, R.A (Ed.) Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 102-131, 2000.

OLIVEIRA, M.C.O. 2002 em [www.cetesb.gov.br](http://www.cetesb.gov.br). Acesso em 02/11/2009.

PERON, K. Análise de diclofenaco de sódio em ETE's do município de Araraquara-SP, Dissertação de mestrado. Instituto de Química de São Carlos, 2007.

POINTING S.B., Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57(1-2):30-33, 2001.

PRICE, M.S.; CLASSEN, J.J.; PAYNE, G.A. *Aspergillus niger* absorbs copper and zinc from swine wastewater. *Bioresource Technology*, 77(1):41-9, 2001.

QUINTANA, J.B., WEISS, S.; REEMTSMA, T. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research*, 39, 2654–2664, 2005

REN, W.X.; LI, P.J.; GENG, Y, LI, X.J. Biological leaching of heavy metals from a contaminated soil by *Aspergillus niger*. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1-3):164-169, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIN, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27(5):771-780, 2005.

ROCHA, S.R.; BEATI, A.A.G.F.; OLIVEIRA, J.G.; LANZA, M.R.V. Avaliação da degradação do diclofenaco sódico utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fenton em reator eletroquímico. *Química Nova*, 32(2):354-358, 2009.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M.J.; BARCELÓ,D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass

spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *Journal of Chromatography A*, 1152(1-2):97-115, 2007.

SANDERSON, H.; BRAIN, R.A.; JOHNSON, D.J.; WILSON, C.J.; SOLOMON, K.R. Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular and sex hormones. *Toxicology*, 203(1-3):27-40, 2004.

SHAH, V.; NERUD, F. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. Review. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(10):857-870, 2002.

SHUCHARA, E.A. Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de fármacos em fluidos biológicos e amostras ambientais por cromatografia líquida e gasosa. (Tese de doutorado) UFSC, 2007.

SCHWAIGER, J.; FERLING, H.; MALLOW, U.; WINTERMAYR, H.; NEGELE, R.D. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68(2):141-150, 2004.

SPARIDANS, R.W.; LAGAS, J.S.; SCHINKEL, A.H.; SHELLENS, J.H.M.; BEIJNEN, J.H. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for diclofenac and three primary metabolites in mouse plasma. *Journal of Chromatography B*, 872(1-2):77-82, 2008.

STUMPF, M.; TERNES, T.A.; WILKEN, R.-D.; RODRIGUES, S.V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of the Total Environment*, 225(1-2):135-141, 1999.

THE MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13. ed New Jersey: MERCK, 1818 p, 2001.

VERENITCH, S.S.; LOWE, C.J., MAZUMDER, A. Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion

trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2):93-103, 2006.

WEBSTER,R.; PACEY, M.; WINCHESTER, T.; JOHNSON, P.; JEZEQUEL, S. Microbial oxidative metabolism of diclofenac: production of 4'-hydroxydiclofenac using *Epicoccum nigrum* IMI354292. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(4):371-376, 1998.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S.N. White rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22(1-2), 161-187, 2003.

XIU-SHENG, M.; KOENIG, B.G.; METCALFE, C.D. Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 952(1-2):139-147, 2002.

ZHANG, Y.; GEISSEN, S.; GAL, C. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73(8):1151-1161, 2008.

ZWIENER, C.; FRIMMEL, F.H. Short-term tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibric acid, ibuprofen, and diclofenac. *Science and the Total Environment*, 309(1-3):201-211, 2003.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)